



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**OPTIMALIZACE MIKROREOLOGICKÝCH TECHNIK
PRO CHARAKTERIZACI BIOPOLYMERNÍCH GELŮ**

OPTIMIZATION OF TECHNIQUES OF MICRORHEOLOGY FOR CHARACTERIZATION
OF BIOPOLYMER HYDROGELS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Alica Dušenková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1135/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Alica Dušenková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Optimalizace mikoreologických technik pro charakterizaci biopolymerních gelů

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracovat literární rešerši na téma využití mikoreologických technik při studiu hydrogelových materiálů.
2. Na základě literární rešerše na vybraném modelovém hydrogelu otestovat využitelnost mikoreologických technik v dispozici CMV při jeho charakterizaci.

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Alica Dušenková
student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Hlavným cieľom tejto bakalárskej práce je optimalizácia mikrorheologických techník pre charakterizáciu biopolymérnych hydrogélů. K tomu boli využité hydrogély na základe termoreverzibilného biopolyméru – agarózy. Skúmaný bol vplyv inkorporovaného polyelektrolytu (polystyrensulfony sodného) na štruktúru a viskoelastické vlastnosti agarózového hydrogélů, a to prostredníctvom fluorescenčných značených častíc, ktoré boli začleňované do štruktúry gélů. Zmena výslednej štruktúry bola najprv pozorovaná prostredníctvom difúzných koeficientov a po úspešnej optimalizácii boli stanovené aj MSD krivky. Meranie bolo uskutočnené fluorescenčnou korelačnou spektroskopiou.

ABSTRACT

The main aim of the bachelor thesis is optimalization of microrheological techniques for characterization of biopolymer hydrogels. Hydrogels, based on thermoreversible biopolymer agarose, were selected for these experiments. The influence of incorporated poly(sodium 4-styrenesulfonate) on structure and viscoelastic properties of agarose hydrogels was investigated through diffusion coefficient and MSD curves. Microrheological properties were studied by fluorescence correlation spectroscopy, by using fluorescent beads, which were embedded in hydrogel systems.

KEÚČOVÉ SLOVÁ

Hydrogély, agaróza, mikrorheológia, fluorescenčná korelačná spektroskopia

KEYWORDS

Hydrogels, agarose, microrheology, fluorescence correlation spectroscopy

DUŠENKOVÁ, A. *Optimalizace mikrореologických technik pro charakterizaci biopolymerních gelů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 38 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že som všetky použité zdroje správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a ku komerčným účelom môže byť využitá len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

Podpis študenta

Pod'akovanie:

Rada by som touto cestou poďakovala vedúcemu bakalárskej práce Ing. Petru Sedláčkovi Ph.D. za trpezlivosť, cenné rady a pomoc pri vypracovaní bakalárskej práce. Taktiež by som chcela poďakovať Bc. Katce Bílkové a Ing. Marcelu Laštůvkové za pomoc v experimentálnej časti práce. Pod'akovanie patrí aj mojej rodine a blízkym za neustálu podporu počas celého môjho štúdia.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1.	Hydrogély	8
2.2.	Biopolymérne hydrogély	8
2.2.1.	Agaróza	9
2.2.2.	Chitosan	9
2.2.3.	Alginát.....	10
2.2.4.	Karagenan	10
2.3.	Mikroreológia	11
2.3.1.	Reológia	11
2.3.2.	Viskoelasticita.....	12
2.3.3.	Princíp mikroreológie	12
2.3.4.	Metódy stanovenia pasívnej mikroreológie	14
2.3.4.1.	Dynamický rozptyl svetla	14
2.3.4.2.	Jednočasticová mikroreológia	15
2.3.4.3.	Dvojčasticová mikroreológia	16
2.4.	Fluorescenčná korelačná spektroskopia	16
2.4.1.	Jav fluorescencie	16
2.4.2.	Princíp fluorescenčnej korelačnej spektroskopie	18
2.4.3.	Aparatúra fluorescenčnej korelačnej spektroskopie	19
3	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	21
3.1.	Makroreologická charakterizácia.....	21
3.2.	Mikroreologická charakterizácia	21
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	24
4.1.	Použité chemikálie.....	24
4.2.	Použité prístroje	24
4.3.	Príprava vzoriek.....	24
4.3.1.	Fluorescenčne značené častice.....	24
4.3.2.	Zásobný roztok polystyrensulfonátu sodného	24
4.3.3.	Agarózové hydrogély.....	24
4.4.	Nastavenie FCS	25
4.4.1.	Parametre a kalibrácia FCS.....	25

	4.4.2. Navrhovaný postup merania FCS	25
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA	26
	5.1. Optimalizácia postupu merania	26
	5.2. MSD krivky v závislosti na zložení gélov	29
6	ZÁVER.....	32
7	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	34
8	PRÍLOHA	38

1 ÚVOD

Reológia je významný odbor popisujúci z makroskopického hľadiska viskoelastické vlastnosti materiálov skúmaním ich deformácie a toku pod vplyvom vonkajších mechanických síl. Reológiu pri skúmaní heterogénnych materiálov nahradila postupne mikroreológia, ktorá poskytuje pohľad na lokálne viskoelastické vlastnosti, ktoré sa môžu líšiť od vlastností získaných prostredníctvom klasickej reológie. Mikroreológia je súbor metód založených na inkorporovaní mikročastíc do štruktúry sledovaných systémov a následnom aktívnom alebo pasívnom manipulovaní týchto častíc.

K štúdiu viskoelastických vlastností hydrogélů bola v tejto bakalárskej práci zvolená metóda fluorescenčnej korelačnej spektroskopie (FCS), ktorá, ako jedna z pasívnych metód, sleduje tepelný pohyb inkorporovaných fluorescenčne značených častíc. Metóda FCS je široko využívaná hlavne pri skúmaní bunkových systémov, ale aj pri sledovaní procesov difúzie či stanovení lokálnych koncentrácií fluoreskujúcich komponentov rôznych komplexných systémov. FCS metóda sa pri skúmaní hydrogélů zaoberá prevažne stanovovaním parametrov difúzie, ale vedeckých prác zameraných na ich viskoelastické vlastnosti je len veľmi málo.

Hlavnou náplňou bakalárskej práce je optimalizácia nastavenia FCS k skúmaniu štruktúry agarózového hydrogélů za účelom získania komplexného pohľadu na viskoelastické vlastnosti tak, aby bola táto metóda využiteľná aj pri skúmaní iných hydrogélůvých systémov. Agaróza bola zvolená kvôli jednoduchej príprave termoreverzibilného hydrogélů, ktorého vlastnosti je možné meniť inkorporovaním polyelektrolytov, čo má vplyv na výslednú štruktúru a viskoelastické vlastnosti vzniknutého hydrogélů. Do štruktúry agarózového hydrogélů bol pridávaný polystyrensulfonát sodný. Reologické vlastnosti agarózy boli študované už v mnohých vedeckých prácach, avšak chýba unifikovaný spôsob prepojenia viskoelastických vlastností na makroskopickej a mikroskopickej úrovni.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1. Hydrogély

Gély sú disperzie tuhých látok v kvapaline, čo znamená, že ide o systémy, kde za určitých podmienok dochádza k prepojeniu disperzných častíc za vzniku sieťovej štruktúry prestupujúcej celým disperzným prostredím. Klasifikujeme ich podľa viacerých kritérií. Na základe adhézných síl, ktoré pútajú disperzné častice, rozlišujeme gély *chemického* a *fyzikálneho* charakteru. Podľa toho či obsahujú, alebo neobsahujú rozpúšťadlo, rozlišujeme *lyogély* a *xerogély*. Vysušením lyogélu vzniká xerogél, ktorý je v určitých prípadoch schopný prijímať disperzné prostredie, a vrátiť sa tak do pôvodného stavu. Na základe toho delíme gély na *reverzibilné* (vratné) a *ireverzibilné* (nevratné). Dôležité je rozdelenie podľa charakteru disperzného prostredia, pretože od toho sa odvíjajú ďalšie významné vlastnosti gélov. Disperzné prostredie organogélov tvorí organická kvapalina, gély tvorené vodným disperzným prostredím nazývame hydrogély. [1]

Hydrogély sú tvorené trojrozmernou sieťou polymérnych väzieb a vodou, ktorá vyplňuje priestor medzi nimi. Schopnosť hydrogélů absorbovať vodu vychádza z hydrofilných funkčných skupín tvoriacich polymérnu sieť, zatiaľ čo odolnosť voči rozrušeniu štruktúry súvisí so stupňom zosieťovania hydrogélu. Prítomnosť hydrofóbných monomérov reguluje vlastnosti daného hydrogélu. [2]

Hydrogély rozlišujeme podľa viacerých kritérií. Na základe prítomnosti, resp. absencie elektrického náboja v sieťovej štruktúre rozlišujeme *neutrálne*, *iónové* (aniónové alebo kationové) a *amfoterné* (obojaké) hydrogély. Podľa typu adhézných síl, ktorými je udržiavaná pevnosť sieťovej štruktúry, rozoznávame hydrogély *fyzikálneho* alebo *chemického* charakteru. Štruktúra hydrogélu s chemickými väzbami je pevná a odpovedá správaniu elastických látok, zatiaľ čo stabilita fyzikálneho hydrogélu závisí od pevnosti vytvorenej sieťovej štruktúry a od fyzikálnych interakcií. Dôležité je delenie hydrogélů podľa pôvodu polymérov tvoriacich štruktúru hydrogélu. Hydrogél môže byť tvorený prírodnými polymermi (biopolymermi), syntetickými polymermi alebo môže byť vytvorený ich kombináciou. Synteticky vytvorené hydrogély v mnohých prípadoch nahrádzajú prírodné, pretože majú pevnejšiu štruktúru, dlhšiu životnosť a vyznačujú sa väčšou absorpčnou kapacitou. [2]

Hydrogély sú predmetom dlhoročných výskumov a dôležitým materiálom vďaka vysokému aplikačnému potenciálu v mnohých priemyselných oblastiach. Jedná sa hlavne o biopolymérne hydrogély, ktoré môžu byť využité napr. v tkanivovom inžinierstve alebo v iných oblastiach farmácie a medicíny. Hlavným dôvodom je schopnosť hydrogélů bobtnať a udržiavať vo svojej štruktúre značné množstvo vody. Do polymérnej siete je taktiež možné inkorporovať a imobilizovať reťazce vhodne zvolených polyelektrolytov. Vďaka tomu je možná jednoduchá úprava výsledných vlastností pripravených hydrogélů. [2]

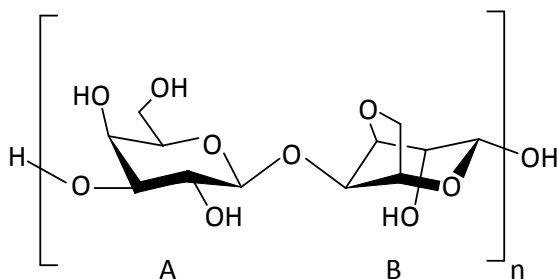
2.2. Biopolymérne hydrogély

Vo forme hydrogélů sa využívajú biopolyméry extrahované z rastlín, živočíchov alebo z morských rias. Ide o proteíny a polysacharidy, ktoré sa vyznačujú biodegradabilitou a biokompatibilitou, sú považované za obnoviteľný zdroj látok a majú významné fyzikálne

vlastnosti (tvorba filmov, gélové, zahusťovacie vlastnosti apod.). V tejto bakalárskej práci je ako modelový materiál zvolený agarózový hydrogél. Bližšie si popíšeme štruktúrne vlastnosti a využitie nielen agarózy, ale aj, na porovnanie, štruktúru ďalších biopolymérov.

2.2.1. Agaróza

Jednou z foriem agaru, izolovaného z červených morských rias, je agaróza, čo je prírodný lineárny polysacharid tvorený opakujúcimi sa jednotkami disacharidu agarobiózy, zahŕňajúceho β -D-galaktopyranózu, viazanú $\alpha(1,3)$ glykozidovou väzbou a 3,6-anhydro- α -L-galaktopyranózu viazanú $\beta(1,4)$ -glykozidovou väzbou (Obr. 1). Zvyčajne je bez náboja, ale môže obsahovať aj zvyšky nabitých karboxylových, pyruvátových alebo sulfátových skupín. [3]



Obr. 1: Štruktúra agarózy (A: β -D-galaktopyranóza; B: 3,6,anhydro- α -L-galaktopyranóza) [4]

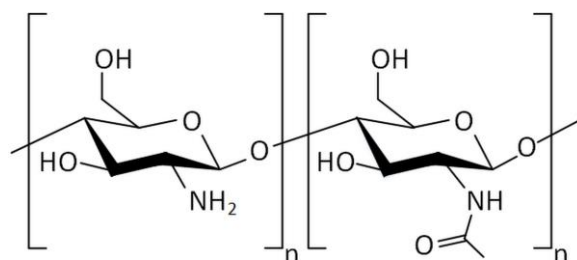
Agarózový termoreverzibilný hydrogél vzniká zahriatím vodnej disperzie agarózy až do úplného rozpustenia a následným ochladením. Uplatňuje sa jav hysterézy, keďže teplota gelácie a teplota tuhnutia nie je zhodná. Veľkosť pórov vytvoreného gélu závisí na koncentrácii agarózy. [3]

Agaróza má vo forme gélu využitie hlavne v oblasti analytickej chémie a biochémie, využíva sa ako nosné médium pri elektroforetickej separácii nukleových kyselín a proteínov. [3] Široké využitie má taktiež v mikrobiológii ako živné médium pri kultivácii mikroorganizmov. V potravinárskom priemysle sú preferované mäksie gély (agar), zatiaľ čo vo farmaceutickom a mikrobiologickom odvetví sa viac využívajú gély, ktoré majú rigidnejšiu štruktúru (agaróza). [5] Agaróza je v súčasnosti predmetom mnohých štúdií, je využívaná v tkanivovom inžinierstve, taktiež v oblasti vývoju nosičov s riadeným uvoľňovaním aktívnych látok. Využívaná je aj ako modelový materiál pre štúdium tkanivového transportu, mikrobiálnych biofilmov alebo bunkových procesov. Dôvodom využitia agarózy v týchto medicínskych aplikáciách je hlavne už spomenutá schopnosť hydrogélů zadržiavať veľké množstvo vody, a s tým spojené využitie vody na výživu a podporu rastu buniek alebo regenerácie tkanív.

2.2.2. Chitosan

Chitín je lineárny polysacharid, syntetizovaný veľkým počtom živých organizmov, tvorený N-acetyl-D-glukozaminovými jednotkami viazanými $\beta(1,4)$ glykozidovou väzbou. Po celulóze je chitín druhým najrozšírenejším polysacharidom. Najvýznamnejším derivátom chitínu je chitosan, lineárny polysacharid, ktorý vzniká alkalickou deacetyláciou a je tvorený β -(1,4)-D-glukozaminovými jednotkami (Obr. 2). V prírode však neexistuje čistý, 100% acetylovaný chitín. Ak látka obsahuje viac ako 50% N-acetyl-D-glukozaminových jednotiek, ide o chitín,

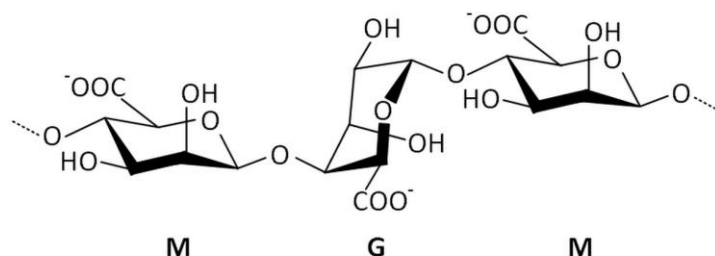
ak obsahuje viac ako 50% glukozaminových jednotiek, tak ide o chitosan. Fyzikálno-chemické vlastnosti chitínu a chitosanu závisia na stupni deacetylácie a na molekulovej hmotnosti. Chitosan je rozpustný v zriedených kyselinách a protonizáciou voľných aminoskupín získava kladný náboj. [5]



Obr. 2: Štruktúra chitosanu (vľavo) vytvoreného deacetyláciou chitínu (vpravo) [6]

2.2.3. Alginát

Algináty sú aniónové polysacharidy, soli kyseliny algínovej, získavané z hnedých morských rias. Štruktúrne ide o blokové kopolyméry, ktoré sú tvorené z monomérov β -D-manuronovej (M) a α -L-guluronovej kyseliny (G) viazanými (1,4) glykozidovou väzbou. [7] Ich fyzikálne vlastnosti sa odvíjajú od molekulárnej štruktúry alginátových väzieb, presnejšie od pomeru M/G a distribúcie týchto monomérov pozdĺž reťazca. Algináty sú schopné v prítomnosti niektorých dvojmocných kationtov tvoriť gél. Vlastnosti vytvorených gélov závisia na obsahu a dĺžke reťazca G, pretože bloky G vytvárajú stabilnejšie gély ako bloky M. [5]

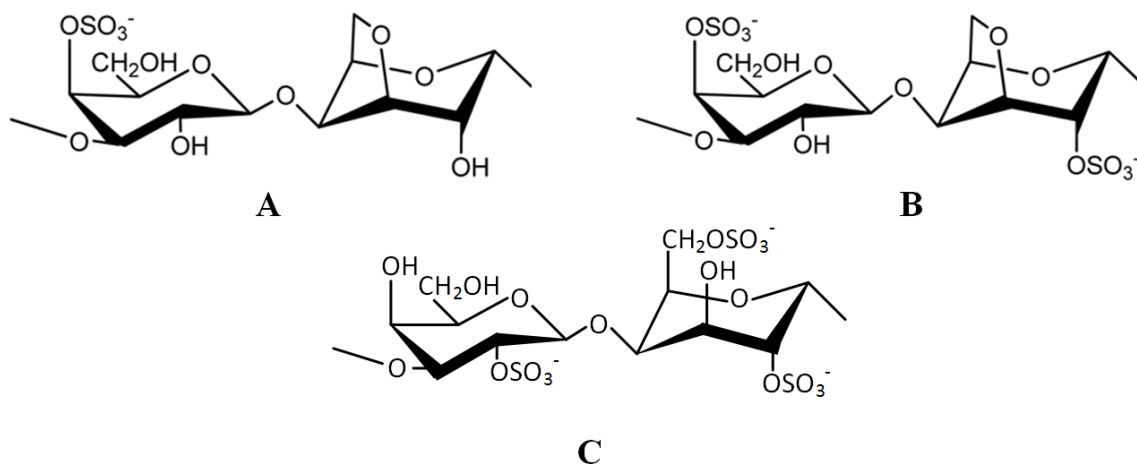


Obr. 3: Naznačenie chemickej štruktúry alginátu: striedanie G a M blokov [8]

2.2.4. Karagenan

Karagenany, rovnako ako agaróza, sú získavané z červených morských rias. Štruktúrne ide o sulfatované D-galaktány tvorené striedajúcimi sa monomérmi β -D-galaktopyranózy, viazanej α (1,3) glykozidovou väzbou, α -L-galaktopyranózy alebo 3,6-anhydro- α -L-galaktopyranózy viazanými β (1,4) glykozidovou väzbou. [9] Existuje viacero foriem karagenanov, no v potravinárskom priemysle je najviac využívaný κ -karagenan, ι -karagenan a λ -karagenan (Obr. 4). Reologické vlastnosti karagenanov závisia od prítomnosti 3,6-anhydro- α -L-galaktopyranózy v štruktúre týchto polymérov. κ -karagenan a ι -karagenan má gélotvorné vlastnosti, zatiaľ čo λ -karagenan má len zahusťovacie vlastnosti. κ -karagenan vytvára rigidný gél v prítomnosti niektorých jednomocných kationtov (K^+ , Rb^+ , Cs^+ a NH_4^+),

zatiaľ čo ι -karagenan vytvára elastický gél s tixotropnými vlastnosťami v prítomnosti vápnika. Výsledkom sú termoreverzibilné gély, ktorých stabilita závisí od koncentrácie daných kationov. [7]



Obr. 4: Chemická štruktúra: A – κ -karagenan, B – ι -karagenan, C – λ -karagenan [9]

2.3. Mikroreológia

Predmetom mikroreológie je štúdium reologických vlastností na mikroskopickej úrovni. Mikroreologické metódy nahrádzajú reológiu pri skúmaní komplexnejších štruktúr, pretože v takýchto prípadoch už reológia na ich presnú charakterizáciu nestačí. Predtým, ako si bližšie popíšeme mikroreológiu, vysvetlíme si základný princíp reologického merania.

2.3.1. Reológia

Predmetom reológie je štúdium deformácie a toku materiálov pod vplyvom mechanických vonkajších síl. Limitné reologické správanie je dané ideálnou (newtonskou) viskóznou kvapalinou a pevným elastickým (hookovským) telesom, avšak väčšina materiálov pôsobením síl vykazuje mechanické správanie, ktoré je charakterizované viskóznymi aj elastickými vlastnosťami. Ide o viskoelastické materiály. [10]

Viskozita ideálnych kvapalín je definovaná Newtonovým zákonom,

$$\sigma = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (1)$$

ktorý popisuje vzťah medzi šmykovým napätím σ a rýchlosťou deformácie (šmykovou rýchlosťou $\dot{\gamma}$) prostredníctvom dynamickej viskozity η , ktorá je v prípade ideálnej kvapaliny konštantná. Pre newtonské kvapaliny platí, že viskozita je látkovou konštantou, čiže nezávisí na rýchlosti deformácie, na dobe trvania toku, príp. na pôsobiacom tlaku. V prípade, kedy je súčiniteľ úmernosti η už závislý na niektorých z týchto uvedených podmienok, môžeme hovoriť o nenewtonských kvapalinách.

Ideálne elastické teleso je charakterizované Hookovým zákonom elasticity:

$$\sigma = G \cdot \gamma \quad (2)$$

kde G je šmykový modul a γ je šmyková deformácia. G vyjadruje tuhosť materiálu a nezávisí na šmykovom napätí ani na dobe trvania deformácie. [10]

2.3.2. Viskoelasticita

Pôsobením mechanických vonkajších síl na elastický materiál dochádza k deformácii, ktorá je priamoúmerná aplikovanému napätiu, elastická energia je uchovávaná, takže po ukončení pôsobenia sa materiál vráti do svojho pôvodného tvaru. To neplatí pre viskózne kvapaliny, kedy dochádza k disipácii energie na teplo a k trvalej deformácii materiálu. Pri viskoelastických materiáloch je tok, resp. elasticita závislá na dobe a miere pôsobenia deformačnej sily. To znamená, že pri dostatočne malom zaťažení vonkajšími silami reaguje materiál na odozvy lineárne a po odstránení pôsobiacej vonkajšej sily sa materiál vráti opäť do pôvodného stavu. Pri väčšom zaťažení už dochádza k trvalému narušeniu štruktúry materiálu. [11]

Viskoelastické materiály sa do určitej miery správajú ako elastické a kvapalné látky zároveň, takže nie je možné z reologického hľadiska určiť presnú hranicu medzi nimi. Vlastnosti materiálov sa matematicky vyjadrujú prostredníctvom elastického modulu G' (prevažuje pre pevné látky) a viskózneho modulu G'' (vyšší pre látky kvapalné). Elastický modul vyjadruje schopnosť materiálu uchovávať energiu, zatiaľ čo viskózny modul súvisí s disipáciou tejto energie. Všeobecne platí, že ak je $G' < G''$, tak v materiáli prevláda viskózna zložka a ak $G' > G''$, tak prevláda zložka elastická. [10]

Klasická reológia, nazývaná aj makroreológia, je založená na používaní reometrov s rôznym geometrickým usporiadaním (valec, kužeľ, doska), pomocou ktorých je skúmaný materiál mechanicky deformovaný a sledovaná je odozva materiálu s cieľom získania viskoelastických vlastností. Pri skúmaní viskoelastických materiálov, v tomto prípade hydrogélom, je dôležitá oblasť lineárneho viskoelastického režimu, ktorá sa určuje prostredníctvom amplitúdových testov (*strain sweep*), čo je závislosť viskoelastických modulov na zvyšujúcej sa amplitúde deformácie pri konštantnej frekvencii oscilácie geometrie reometru. V oblasti lineárneho viskoelastického režimu sú následne reometrom, prostredníctvom rôznych testov, skúmané vlastnosti hydrogélomových systémov. Významné sú teplotné (*temperature sweep*) alebo časové (*time sweep*) testy, čiže závislosť viskoelastických modulov na čase alebo teplote. Tieto testy sa využívajú pri sledovaní starnutia gélu, skúmaní priebehu tvorby či degradácie gélu, bod gelácie/degradácie je daný rovnosťou viskoelastických modulov $G' = G''$. [12] Nevýhodou je, že makroreológia umožňuje skúmanie týchto procesov iba v obmedzenom rozsahu frekvencií, pričom poskytuje len celkovú (priemernú) reologickú odozvu, čo niekedy nestačí na presnú charakterizáciu procesov prebiehajúcich na mikroskopickú úroveň.

2.3.3. Princíp mikroreológie

Mikroreológia využíva k získaniu viskoelastických vlastností pomocné mikročastice, ktoré sú začleňované do vzoriek. Vlastnosti materiálu sú tak získavané narušovaním jeho štruktúry prostredníctvom týchto častíc. Rozoznávame dva základné podskupiny mikroreológie, ktoré sa rozlišujú podľa spôsobu manipulácie so začlenenými časticami. *Aktívna mikroreológia* využíva k pohybu častíc elektrické, magnetické pole, príp. optickú pinzetu, čiže rovnako ako makroreológia, vkladá vonkajší tlak na vzorku. Aktívne metódy sú vhodné v prípadoch, kedy

je potrebné na pevnejšie materiály pôsobiť vysokým tlakom alebo ak chceme skúmať vlastnosti mimo oblasť lineárneho viskoelastického režimu. *Pasívna mikoreológia* je založená na sledovaní Brownovho pohybu začlenených častíc. K získaniu viskoelastických vlastností využíva iba tepelnú energiu, takže nedochádza k deformácii materiálu a skúmaná je oblasť lineárneho viskoelastického režimu. [13] Bližšie sa budeme venovať len pasívnej mikoreológii.

Mikoreologické vlastnosti viskoelastických materiálov sú skúmané prostredníctvom závislostí MSD na čase τ , z ktorých je možné následne stanoviť viskoelastické moduly G' a G'' . MSD („mean square displacement“ alebo „stredný kvadratický posun“, $\langle \Delta r^2(\tau) \rangle$) vyjadruje, ako ďaleko sa častice v závislosti na nejakom časovom intervale pohybujú. Trojdimenzionálne je MSD definovaná ako:

$$\langle \Delta r^2(\tau) \rangle = \langle [x(t+\tau) - x(t)]^2 + [y(t+\tau) - y(t)]^2 + [z(t+\tau) - z(t)]^2 \rangle \quad (3)$$

kde $x(t)$ značí polohu častice v určitom čase t a $x(t+\tau)$ časový posun tejto častice.

V prípade newtonských kvapalín je závislosť MSD na čase lineárna a logaritmický sklon krivky je rovný jednej. MSD newtonských kvapalín je definovaná takto:

$$\langle \Delta r^2(\tau) \rangle = 2dD\tau \quad (4)$$

kde d je dimenzionálny rozmer a D je difúzny koeficient daný Stokes-Einsteinovou rovnicou:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (5)$$

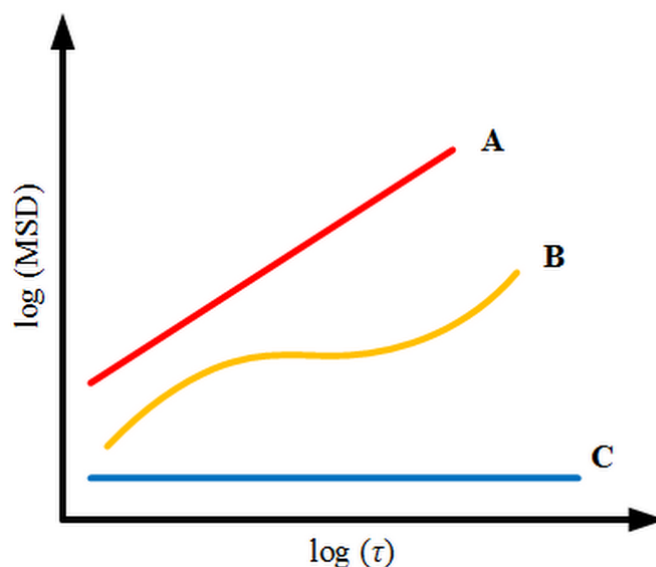
kde k_B je Boltzmannova konštanta, T je teplota, η je dynamická viskozita a a je polomer častice. Opačným prípadom sú ideálne elastické materiály s elastickým modulom G' , kedy MSD nezávisí na čase, viskózný modul a logaritmický sklon je rovný nule. MSD elastických materiálov je následne definovaná takto:

$$\langle \Delta r^2(\tau) \rangle = \frac{dk_B T}{3\pi a G} \quad (6)$$

V prípade už spomenutých viskoelastických materiáloch, ktoré vykazujú určitú mieru viskozity a elasticity zároveň, sa logaritmický sklon pohybuje v rozmedzí od nuly k jednej. Závislosť MSD na čase už nie je lineárna a k výpočtu MSD viskoelastických materiálov sa využíva zovšeobecnená Stokes-Einsteinova rovnica:

$$\langle \Delta \tilde{r}^2(s) \rangle = \frac{dk_B T}{3\pi a s \tilde{G}(s)} \quad (7)$$

kde $\langle \Delta \tilde{r}^2(s) \rangle$ je Laplaceova transformácia MSD, s je Laplaceova frekvencia a $\tilde{G}(s)$ je Laplaceova forma komplexného šmykového modulu G^* , ktorý zahŕňa elastický modul G' a viskózný modul G'' . Na Obr. 5 je znázornený tvar MSD začlenených častíc v spomenutých médiách. [14] [15] Podľa zmien v MSD je možné napr. sledovať priebeh tvorby alebo degradácie hydrogélu, príp. skúmať jeho štruktúru, starnutie, bobtnanie apod. MSD krivky budú podrobnejšie popísané v experimentálnej časti.



Obr. 5: Tvar MSD pre pohyb začlenených častíc v rôznych médiách: A – viskózne médium, B – viskoelastické médium; C – elastické médium [15]

Mimoriadnou výhodou mikrorheológie je, že na analýzu je potrebné len veľmi malé množstvo vzorku (niekoľko mikrolitrov), čo otvára možnosť skúmania biologických materiálov. Mikrorheológia navyše umožňuje meranie v širšom rozsahu frekvencií, pričom presný rozsah závisí od použitej metódy. Makrorheológia poskytuje len celkový spriemerovaný pohľad na reologickú odozvu materiálov, mikrorheológiou je však možné získať aj údaje o odchýlkach v mikroštruktúre, a tým presnejšie charakterizovať heterogénne systémy. [15] Ďalšou výhodou mikrorheológie je možnosť skúmať systémy, ktoré majú veľmi nízku viskozitu alebo nízku elasticitu, keďže makrorheológia nie je schopná detekovať signál z takýchto systémov. Vďaka tomu je mikrorheológia vhodná pri skúmaní procesu tvorby gélu. Nevýhodné je využitie mikrorheológie pri skúmaní príliš viskózných a rigidných štruktúr, pretože je náročné zachytiť veľmi malý pohyb častíc. [16] Hnacou silou pasívnej mikrorheológie je iba tepelná energia $k_B T$, takže nedochádza k deformácii vzorku a skúmaná je tak iba oblasť lineárneho viskoelastického režimu. [15]

2.3.4. Metódy stanovenia pasívnej mikrorheológie

K stanoveniu pasívnej mikrorheológie sa využíva mnoho metód: jednočasticová mikrorheológia (*particle tracking microrheology*, PTM) a dvojčasticová mikrorheológia (*two-particle microrheology*, TPM), dynamický rozptyl svetla (*dynamic light scattering*, DLS) a difúzna vlnová spektroskopia (*diffusing wave spectroscopy*, DWS). Široko využívanou metódou je aj fluorescenčná korelačná spektroskopia (*fluorescence correlation spectroscopy*, FCS), ktorá bude popísaná samostatne v kapitole 2.4.

2.3.4.1. Dynamický rozptyl svetla

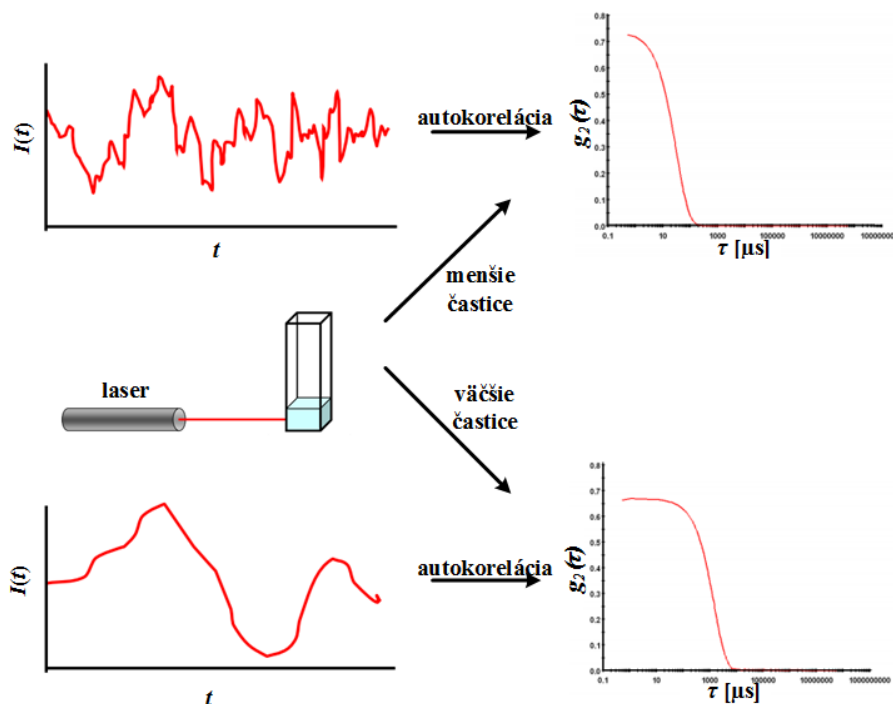
Základným princípom dynamického rozptylu svetla je sledovanie zmien intenzity svetla rozptýleného časticami začlenenými v skúmanom materiáli. K fluktuáciám intenzity svetla dochádza v dôsledku Brownovho pohybu týchto častíc, pričom fluktuácie úzko súvisia s ich veľkosťou (Obr. 6).

Výstupom metódy DLS je autokorelačná funkcia v čase τ :

$$g(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (8)$$

kde I je intenzita, t je čas a priemerná hodnota v čase je naznačená ostrými zátvorkami. Táto metóda je väčšinou využívaná k stanoveniu veľkostí častíc, je ju však možné využiť aj na stanovenie viskoelastických vlastností neznámeho materiálu, a to pridaním častíc o známej veľkosti. Z autokorelačnej funkcie je následne možné pomocou určitých matematických úprav stanoviť MSD krivky a viskoelastické moduly. [14]

Metóda DLS je použiteľná pre rôzne polymérne látky, emulzie, suspenzie či gély, pričom tieto materiály musia byť transparentné, aby sa predišlo viacnásobnému rozptylu svetla. Metódu DLS pri skúmaní zakalených komplexných materiálov viacnásobným rozptylom svetla nahrádza difúzna vlnová spektroskopia. V porovnaní s klasickou reológiou, poskytujú tieto rozptylové techniky širší frekvenčný rozsah, no aj napriek tomu sú výstupom týchto metód iba spriemerované reologické vlastnosti. [16]



Obr. 6: Zmeny v časových fluktuáciách intenzity a následne v autokorelačnej funkcii v závislosti na veľkosti častíc. [17]

2.3.4.2. Jednočasticová mikrereológia

Jednočasticová mikrereológia je založená na sledovaní Brownovho pohybu začlenených častíc a analyzovaní ich trajektórií prostredníctvom videomikroskopie, pričom sú častice analyzované jednotlivo. Metóda je teda vhodná pri skúmaní lokálnych viskoelastických vlastností materiálu v okolí jednotlivých začlenených častíc. [18] Výstupom tejto metódy môžu byť aj spriemerované stredné kvadratické posuny MSD častíc, čím by sme získali informácie o viskoelastických vlastnostiach materiálu ako celku, ktoré by boli presné iba pre

homogénne materiály. V prípade heterogénnych materiálov by bolo potrebné samostatne analyzovať stovky rôznych častíc. Výsledky totiž výrazne závisia na veľkosti, type použitých začlenených častíc a na prípadných interakciách s okolitým prostredím, čím môže dôjsť k tomu, že spriemerované MSD krivky častíc nebudú zhodné so skutočnými vlastnosťami skúmaného heterogénneho materiálu. [14]

2.3.4.3. Dvojčasticová mikrореológia

Dvojčasticová mikrореológia, už ako z názvu vyplýva, je založená na skúmaní kros-korelačného pohybu dvoch začlenených častíc. Tento pohyb nie je ovplyvnený veľkosťou a typom častíc ako v prípade jednočasticovej mikrореológie, taktiež nie je závislý na interakciách povrchu častice s prostredím. Metóda sa zaoberá iba vzájomnou vzdialenosťou dvojíc začlenených častíc, čím poskytuje viskoelastické vlastnosti heterogénneho materiálu ako celku. Podmienkou je, že polomer začlenených dvojíc častíc musí byť menší ako je ich vzdialenosť, aby nedošlo k vzájomnému prekrytiu týchto častíc. [14] [16]

2.4. Fluorescenčná korelačná spektroskopia

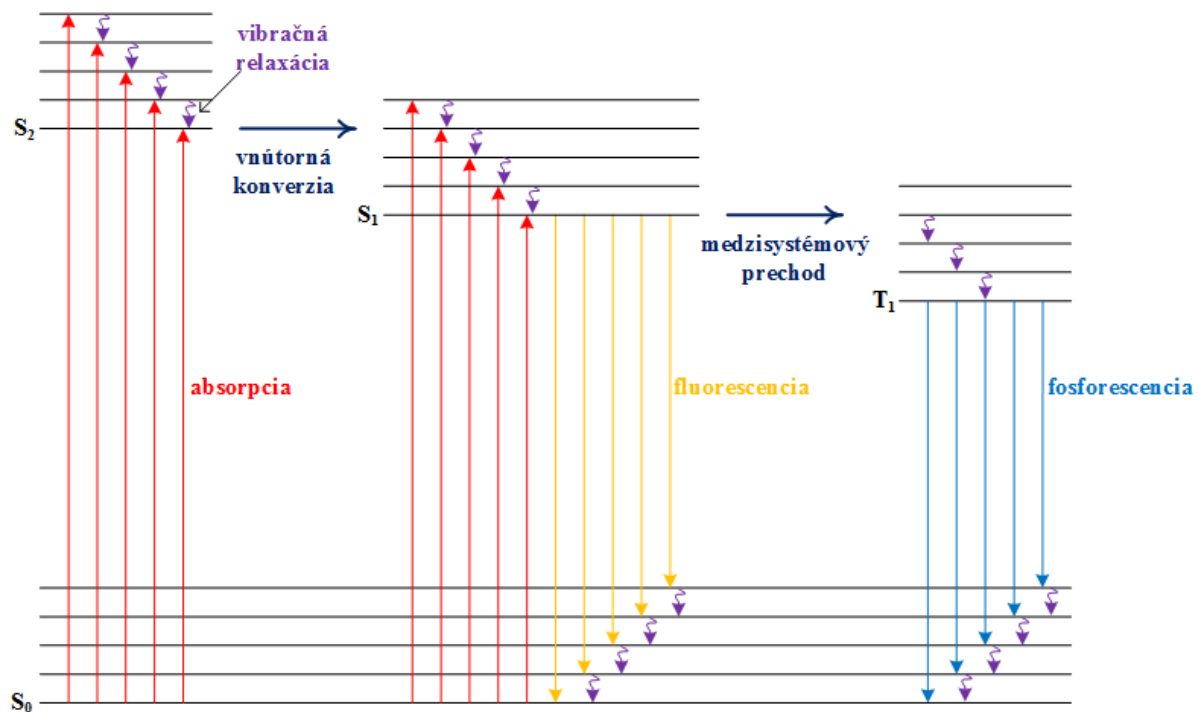
Fluorescenčná korelačná spektroskopia bola prvýkrát predstavená vedcami W. Webb a R. Rigler na začiatku sedemdesiatych rokov. Pre FCS metódu bol mimoriadne dôležitý objav konfokálnej optiky, čo umožnilo sledovať vzorky na úrovni malého počtu sledovaných molekúl. Vďaka vyššej citlivosti a inštrumentácii FCS spolu s konfokálnymi laserovými skenovacími mikroskopmi sa v nasledujúcich rokoch mimoriadne zvýšila využiteľnosť tejto metódy. Pred charakterizovaním tejto metódy si najprv bližšie popíšeme základný jav fluorescencie. [19]

2.4.1. Jav fluorescencie

Luminiscencia je emisia svetla látkou z excitovaného stavu, do ktorého sú elektróny privedené absorbovaním určitého druhu energie (napr. chemiluminiscencia, energia uvoľnená chemickou reakciou alebo fotoluminiscencia, energia elektromagnetického žiarenia). Z dôvodu veľkého energetického rozdielu medzi S_1 a S_0 je na absorpciu využitá energia určitého žiarenia a nie tepelná energia. Podľa spôsobu excitácie elektrónov rozlišujeme fluorescenciu a fosforescenciu. Pri *fluorescencii* dochádza k návratu elektrónu zo singletového excitovaného stavu (S_n) na stav základný (S_0), pričom tento jav je spinovo dovolený, takže doba života fluorescencie je okolo 10^8 s. Doba života *fosforescencie* je väčšia, rádovo 10^0 až 10^3 s, pretože ide o návrat nie zo singletového stavu (S_n), ale zo stavu tripletového (T_n), čo je spinovo zakázané. [20]

Energia elektrónu získaná pri excitácii je uvoľňovaná nielen spomenutými žiarivými prechodmi (fluorescencia a fosforescencia), ale aj prostredníctvom nežiarivých prechodov. Medzi tieto nežiarivé prechody patrí: vibračná relaxácia, vnútorná konverzia a medzisystémový prechod. Po absorpcii žiarenia je väčšinou elektrón molekuly excitovaný na vibračnú podhladinu určitého excitovaného stavu (S_n , prípadne T_n), nastane *vibračná relaxácia*, čiže rýchly prechod na najnižšiu vibračnú podhladinu excitovaného stavu sprevádzaný vyžiareníím tepelnej energie. K *vnútornej konverzii* môže dôjsť v prípade prekryvania vibračnej podhladiny excitovaného stavu S_n s vibračnými podhladinami základného stavu S_{n-1} , pričom sa výrazne nezmení energia elektrónu. *Medzisystémový*

prechod sa uplatňuje pri fosforescencii, čiže pri prechode zo singletového stavu S_1 do tripletového stavu T_1 . [20] Všetky tieto základné popísané javy znázorňuje Jablonskiho diagram (Obr. 7)



Obr. 7: Jablonskiho diagram znázorňujúci základnú elektrónovú hladinu S_0 , dve excitované singletové hladiny S_1 , S_2 a tripletovú excitovanú hladinu T_1 [21]

Medzi najdôležitejšie charakteristiky fluoroforu patrí kvantový výťažok fluorescencie a doba života fluoroforu. Doba života určuje priemerný čas, po ktorý sa fluorofor zdržiava v excitovanom stave, predtým ako sa vráti do základného singletového stavu. Kvantový výťažok fluorescencie je pomer počtu fotónov emitovaných k počtu absorbovaných. Doba života je daná:

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (9)$$

a kvantový výťažok je daný:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (10)$$

kde Γ predstavuje rýchlostnú konštantu žiarivého prechodu (emisia fotónu) a k_{nr} rýchlostnú konštantu nežiarivého prechodu. Rýchlostná konštanta nežiarivého prechodu zahŕňa aj faktory spôsobujúce zhášanie fluorescencie (statické a dynamické zhášanie), a tým pádom zníženie kvantového výťažku. Rozhodujúci je teda výber správneho fluoroforu s čo najväčším kvantovým výťažkom a s fotostabilitou, aby sme získali čo najjasnejšiu emisiu. [20]

2.4.2. Princíp fluorescenčnej korelačnej spektroskopie

FCS je založená na analýze časových fluktuácií intenzity fluorescence, ktoré sú výsledkom rôznych dynamických procesov. Medzi tieto procesy patrí translačná alebo rotačná difúzia fluorescenčných častíc cez konfokálny objem, prípadne procesy spojené napríklad s medzisystémovým prechodom do tripletového stavu. Analýzou rýchlosti a amplitúdy zmien v intenzite fluorescence umožňuje FCS získanie základných informácií o priemernom počte fluorescenčných častíc v konfokálnom objeme a o ich priemernom difúznom koeficiente v skúmanom materiáli. Výsledkom je autokorelačná funkcia $G(\tau)$:

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (11)$$

kde $I(t)$ je intenzita fluorescenčného signálu v aktuálnom čase t , $I(t+\tau)$ odpovedá intenzite po určitom časovom posune τ . Autokorelačná funkcia má maximum pre malé časy τ a pre dlhšie časy τ klesá funkcia k nule, pretože hodnoty intenzity fluorescence na začiatku a na konci intervalu už spolu nesúvisia. [22]

V porovnaní s tradičným meraním intenzity fluorescence, je táto metóda založená na skúmaní molekúl pravidelne difundujúcich cez konfokálny objem, čo umožňuje ich sledovanie nepretržite v priebehu dlhšieho časového rozsahu. Od tradičnej fluorescenčnej spektroskopie sa taktiež líši tým, že merania sú najlepšie prevedené pri sledovaní malého množstva fluorescenčných častíc (ideálne 1 častica na femtoliter) v konfokálnom objeme. [20]

FCS patrí v súčasnosti medzi najpokročilejšie pasívne mikroeologické techniky. Spolu s potrebou nízkej koncentrácie fluorescenčných sond v konfokálnom objeme a s potrebou len veľmi malého množstva vzorku (10 mikrolitrov) je táto metóda veľmi významná pri skúmaní hlavne biologických materiálov. Tak ako aj u ostatných pasívnych metód, aj pomocou FCS je možné získať MSD a viskoelastické moduly začlenených častíc, v tomto prípade fluorescenčných častíc [20]

Autokorelačná funkcia $G(0)$ v čase $\tau = 0$ určuje priemerný počet fluoroforov N v konfokálnom objeme:

$$N = \frac{1}{G(0)} \quad (12)$$

Z čoho vyplýva, že amplitúda $G(\tau)$ je väčšia pre menší počet molekúl v konfokálnom objeme. To je hlavný dôvod, prečo bola FCS v minulosti nepoužiteľná. Bez zredukovania konfokálneho objemu prostredníctvom konfokálnej optiky bol počet sledovaných molekúl príliš veľký a amplitúdy funkcie $G(\tau)$ príliš nízke na to, aby sa získali spoľahlivé výsledky. Počet fluoroforov v konfokálnom objeme je daný aj rovnicou:

$$N = \bar{C}V_{eff} \quad (13)$$

kde V_{eff} je efektívny (konfokálny) objem. Neplatí však, že koncentráciu daného fluoroforu je možné určiť len z priemerného počtu fluoroforov N , pretože konfokálny objem sa stále mení. K tomu, aby sme mohli určiť difúzny koeficient a koncentráciu, je nutné najprv určiť rozmery

konfokálneho objemu. Na to sa využívajú roztoky fluorescenčných častíc so známymi difúznymi koeficientmi. Súvisí to s difúznym časom, ktorý závisí na rozmere w_{xy} sledovaného objemu. Získané vlastnosti skúmaného materiálu sa tým pádom odvíjajú od presného poznania rozmerov konfokálneho objemu. [20]

Pre $G(\tau)$ platí:

$$G(\tau) = \frac{1}{\overline{N}} \left(1 + \frac{4}{w_{xy}^2} D \tau \right)^{-1} \left(1 + \frac{4}{w_z^2} D \tau \right)^{-1/2} \quad (14)$$

kde w_{xy} a w_z predstavujú rozmery konfokálneho objemu, v rovine kolmej a v rovine rovnobežnej s optickou osou. D je difúzny koeficient, ktorý je definovaný ako:

$$D = \frac{\langle \Delta r^2(\tau) \rangle}{6\tau} \quad (15)$$

Difúzny koeficient je možné vyjadriť aj prostredníctvom už spomínaného difúzneho času τ_D :

$$D = \frac{w_{xy}^2}{4\tau_D} \quad (16)$$

Dosadením difúzneho koeficientu (15) do rovnice (14) získame:

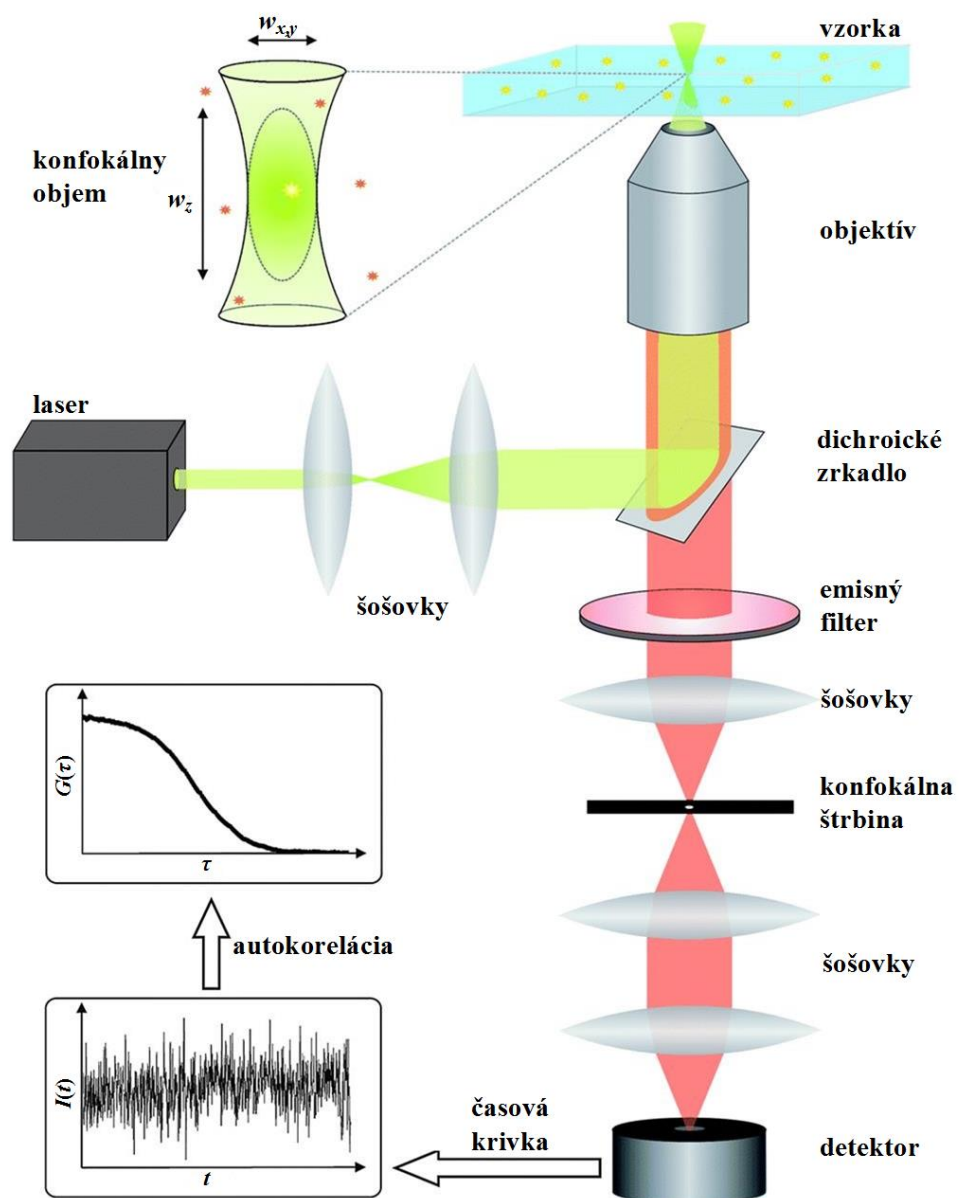
$$G(\tau) = \frac{1}{\overline{N}} \left(1 + \frac{2}{3w_{xy}^2} \langle \Delta r^2(\tau) \rangle \right)^{-1} \left(1 + \frac{2}{3w_z^2} \langle \Delta r^2(\tau) \rangle \right)^{-1/2} \quad (17)$$

Pravá strana rovnice môže byť zanedbaná v prípade, že $\langle \Delta r^2(\tau) \rangle \ll \frac{3w_z^2}{2}$, čím získame rovnicu pre výpočet MSD $\langle \Delta r^2(\tau) \rangle$ [23]:

$$\langle \Delta r^2(\tau) \rangle = \frac{3}{2} w_{xy}^2 \left(\frac{1}{\overline{N}G(\tau)} - 1 \right) \quad (18)$$

2.4.3. Aparatúra fluorescenčnej korelačnej spektroskopie

Základom FCS aparatúry (Obr. 8), je invertovaný konfokálny mikroskop. Laserový lúč excitačného svetla je fokusovaný systémom šošoviek a objektívom na konfokálny objem elipsoidného tvaru. Časť emitovaného svetla je následne pomocou dichroického zrkadla a emisného filtru oddelená od excitačného žiarenia. Emitované svetlo je fokusované na konfokálnu štrbinu (*pinhole*), ktorá blokuje svetlo pochádzajúce z oblasti mimo ohniskovú rovinu. Fotóny prechádzajúce konfokálnou štrbinou sú následne detekované a výsledkom sú časové fluktuácie intenzity a autokorelačná funkcia. [24]

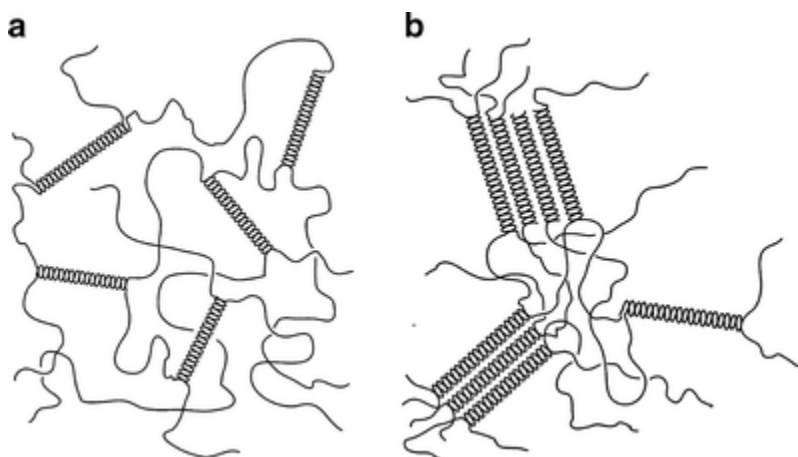


Obr. 8: Typická aparátúra FCS spolu so znázornením konfokálneho objemu, časových fluktuácií intenzity fluorescence a výslednej autokorelačnej funkcie. [22]

3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

3.1. Makroreologická charakterizácia

Skúmaním priebehu tvorby agarózového hydrogél z makroreologického hľadiska sa zaoberali autori štúdie [25]. Uskutočnili teplotné testy, kedy boli vzorky opakovane zahriate (80°C) a ochladené (20°C). Tvar kriviek výsledného elastického modulu naznačuje, že molekuly agarózy podliehajú počas gelácie niekoľkým konformačným zmenám. Súvisí to s teóriou, ktorá bola predmetom už mnohých štúdií. [26] [27] Postupným ochladzovaním dochádza najprv k pospájaniu jednotlivých agarózových reťazcov do dvojzávitníc, následne sa tieto dvojzávitnice zoskupujú do trojrozsmernej siete stabilizovanej vodíkovými mostíkmi (Obr. 9). Výsledkom je termoreverzibilný hydrogél.



Obr. 9: Znáznornenie procesu gelácie agarózy: pospájanie agarózových reťazcov do dvojzávitníc (a) a stabilizácia týchto dvojzávitníc vodíkovými mostíkmi (b). [25]

Sledovaním zmien vo viskoelastických vlastnostiach a v štruktúre agarózového hydrogél po pridaní alginátu sodného alebo xanthánu sa venovali autori článku [26], a to pomocou makroreológie. Zistili, že po pridaní alginátu sodného sa elastický modul v porovnaní s čistým agarózovým hydrogélom zvýšil, čo predstavuje vyššiu elasticitu takto vytvoreného gélu. Pridanie xanthanu spôsobilo zníženie elastického modulu a zvýšenie rozsahu lineárnej viskoelasticity. Vysvetlili to tým, že polysacharid xanthan vytvára rigidnejšie štruktúry ako polyelektrolyt alginát sodný. Molekuly xanthanu tým pádom obmedzujú difúziu a pohyb agarózových väzieb. Výsledkom je gél, ktorý je stabilnejší voči deformácii. Tieto zmeny v štruktúre skúmali aj pomocou skenovacieho laserového konfokálneho mikroskopu.

3.2. Mikroreologická charakterizácia

V odborných literatúrach zameraných na mikroreologické analýzy je jedna z najviac diskutovaných otázok tá, akým spôsobom ovplyvňuje veľkosť použitých častíc výsledky mikroreologických meraní. Častice, ktoré majú priemer väčší ako je veľkosť pórov, určujú viskoelastické vlastnosti materiálu ako celku. Použitie častíc výrazne menších ako je veľkosť pórov neposkytne pohľad na prípadné heterogenity vo vzorke, pretože tieto častice sa budú pohybovať v póroch s disperzným prostredím a výsledkom teda budú MSD krivky odpovedajúce viskoelastickým vlastnostiam samotného disperzného prostredia, nie materiálu.

Pred výberom častíc a samotným meraním je dôležité poznať aspoň približne štruktúru skúmaného materiálu. [18] [28]

Na dôležitosť použitia iných štatistických charakteristík za účelom presnejšieho stanovenia heterogenity poukázali autori práce [18], ktorí okrem agarózového hydrogélú skúmali taktiež F-aktín a vodný roztok glycerolu. Pomocou videomikroskopie sledovali v detekčnom objeme približne 100 fluorescenčne značených častíc. Určili, že limitujúcim faktorom je detekčný objem, pretože nie je možné získať dostatočne dlhé trajektórie častíc, čím sa zredukuje štatistická presnosť MSD kriviek. Tento spôsob preto nie je vhodný na získanie presných informácií o prítomných heterogenitách v skúmaných materiáloch. Z tohto dôvodu pristúpili na tzv. „*formal statistical test*“, zoskupili individuálne častice podľa rovnakej mikroskopickej odpovede a skúmali prípadné odchýlky v okolitom prostredí. Takto už bolo možné identifikovať a charakterizovať mikroštruktúru a heterogenitu skúmaných materiálov. Pri skúmaní agarózového hydrogélú zistili, že jednotlivé póry sa líšia vo veľkosti a v ich lokálnej viskozite. Autori na tomto príklade ukázali, že je naozaj nutné bližšie skúmať štruktúru na mikroskopickej úrovni.

Popisom štruktúry agarózového hydrogélú prostredníctvom skúmania difúzných procesov v závislosti na veľkosti použitých začlenených častíc sa zaoberali aj autori článku [29]. Zvolili k tomu rôzne častice o veľkosti 1–140 nm, ktorých difúziu skúmali prostredníctvom FCS, keďže FCS oproti ostatným technikám umožňuje skúmať široké rozmedzie veľkostí častíc. Zistili, že v prípade 1,5 hm.% agarózového hydrogélú boli schopné pohybu iba častice s polomerom do 70 nm. Pri sledovaní menších častíc (rhodamin) bol určený gél ako homogénny, avšak so zvyšujúcim sa polomerom častíc sa zvyšovali aj odchýlky v nameraných výsledkoch.

Autori článku [30] skúmali metódou FCS štruktúru agarózového hydrogélú (1,5 hm.%). Zisťovali priemernú veľkosť pórov a distribúciu veľkosti prázdnych priestorov, pričom výsledky porovnávali s metódou malouhlového rozptylu neutrónov (SANS). Metódou SANS skúmali taktiež vplyv chloridu vápenatého na veľkosť pórov. V prípade FCS použili sondy s rôznym polomerom: Rhodamin 6G, parvalbumin a R-phycoerythrin.

Pomocou techniky dynamického rozptylu svetla (DLS) a Ramanovej spektroskopie skúmali autori článku [31] spojitosť medzi procesom tvorby gélu a postupným pútaním molekúl vody do väzieb agarózového hydrogélú pripraveného ochladzovaním vodného roztoku agarózy. Skúmali závislosť komplexnej viskozity a elastického modulu G' na teplote v priebehu ochladzovania roztoku pri troch rôznych koncentráciách agarózy. Pozorovali dvojstupňový nárast (najprv mierny, potom výrazný) komplexnej viskozity a aj G' , čo sa zhoduje s vyššie spomenutou teóriou tvorby agarózového gélu. Teplotu, pri ktorej došlo k výraznému nárastu komplexnej viskozity a G' určili ako kritickú teplotu gelácie. Ramanove spektrá boli získané pri troch rôznych koncentráciách a výrazný nárast intenzity pásu bol sledovaný iba v okolí 170 cm^{-1} . Tento nárast súvisí s tým, že molekuly vody podliehajú pri procese tvorby gélu zvýšenému pohybu, ktorý súvisí so začleňovaním molekúl vody do štruktúry hydrogélú. Kombinácia DLS a Ramanovej spektroskopie sa ukázala ako úspešná metóda pri skúmaní gelácie, čím autori predpokladajú možnosť použitia tejto kombinácie metód aj pri skúmaní iných biomateriálov.

Agarózové hydrogély majú veľký potenciál taktiež v oblasti vývojev nosičov s riadeným uvoľňovaním aktívnych látok [32] [33]. V súčasnosti je cieľom získať väčšiu kontrolu nad uvoľňovaním a zabrániť tak neúmyselnému uvoľneniu látok do krvného obehu. Autori práce [32] skúmali uvoľňovanie micél zo štruktúry agarózového hydrogélú vplyvom rôznych podmienok. Micély sú vhodné nosiče hydrofóbných aktívnych látok, za určitých podmienok (teplota, pH) disociujú a umožňujú uvoľnenie týchto látok do cieleného média. Micély pozorovali najprv iba vo vodnom prostredí, aby určili dané pH, pri ktorom dochádza k disociácii, a to prostredníctvom dynamického rozptylu svetla a fluorescenčnej spektroskopie. Disociácia nastala pri pH 6,4, čo bolo sledované poklesom intenzity fluorescence aj poklesom dynamického signálu. Makroreologickými technikami skúmali prípadné zmeny vo vlastnostiach agarózového hydrogélú po pridaní micél, avšak neboli pozorovateľné výrazne zmeny vo viskoelastických vlastnostiach ani vo veľkosti pórov. Fluorescenčnou spektroskopiou skúmali správanie agarózových hydrogélú obsahujúcich micély pri rôznom pH (3,3 a 7,4), ako modelová látka bola použitá Nílová červeň. K poklesu intenzity fluorescence došlo iba pri nižšom pH, a to po 41. hodine merania, z čoho vyplýva, že bez zmeny pH, bol tento systém stabilný. Autorom sa takto podarilo vyvinúť materiál, ktorým získavajú väčšiu kontrolu nad uvoľňovaním aktívnych látok, a to zavedením „spúšťača“, v tomto prípade pH, relevantnému k lokálnemu tkanivovému prostrediu.

Uvoľňovaním aktívnych látok sa taktiež zaoberali autori článku [33], ktorí skúmali uvoľňovanie dipyridamolu z agarózového a agaróza-akrylamidového hydrogélú v závislosti na pH opäť pomocou fluorescenčnej spektroskopie. Vysoká intenzita fluorescence bola pozorovaná pri pH 8, kedy uvoľňovanie dipyridamolu do okolitého média bolo veľmi rýchle. V dôsledku silného elektrostatického odpudzovania medzi väzbami pri nižšom pH dochádzalo k pomalšiemu uvoľňovaniu dipyridamolu. Pomalšie uvoľňovanie bolo pozorované aj v prípade agaróza-akrylamidového hydrogélú, pretože v porovnaní s agarózovým hydrogélom má menšiu veľkosť pórov.

Vlastnosťami a biokompatibilitou chitosan/fosfolipidových hybridných hydrogélú sa zaoberali autori článku [34]. Skúmali zmenu vlastností vplyvom rôznej koncentrácie fosfolipidov v hydrogéli. Metódou dynamického rozptylu svetla zistili, že pri vyššej koncentrácii fosfolipidov sa vytvárali väčšie, ale menej stabilnejšie častice, čo bolo sledované poklesom ξ -potenciálu. Po pridaní chitosanu do fosfolipidových roztokov došlo k zníženiu intenzity autokorelačnej funkcie, čo súvisí s tvorbou hydrogélú. Koncentrácia fosfolipidov ovplyvnila rýchlosť tvorby a viskoelastické vlastnosti vytvoreného hydrogélú. Menšia koncentrácia zapríčinila rýchlejší vznik hydrogélú, ale nižší elastický modul. Čo sa týka biokompatibility týchto hybridných hydrogélú, autori sledovali správanie buniek fibroblastov, ktoré sa nachádzali v ich blízkosti. Nedošlo k žiadnym morfológickým zmenám, ani k ovplyvneniu rýchlosti mitózy, z čoho vyplýva, že je možné tieto hybridné hydrogély v budúcnosti využívať v medicínskych aplikáciách. Chitosan bol pomocou dynamického rozptylu svetla skúmaný už skôr autormi práce [35], ktorí sledovali priebeh gelácie po pridaní vodného roztoku glutaraldehydu ku chitosanu rozpusteného v kyseline octovej. Zaoberali sa zmenami v autokorelačných funkciách, na základe čoho určili presný čas tvorby hydrogélú.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1. Použité chemikálie

- Agaróza, Sigma Aldrich,
- Polystyrensulfonát sodný, Poly(sodium 4-styrenesulfonate), Sigma Aldrich
- Latex beads, carboxylate-modified polystyrene, fluorescent yellow-green 0,03 μm , Sigma Aldrich
- Deionizovaná voda (ELGA)

4.2. Použité prístroje

- Ultrazvukový kúpeľ (BANDELIN Sonorex Digitec)
- Analytické váhy (Denver Instrument)
- Fluorescenčný korelačný spektroskop (MicroTime 200, PicoQuant)

4.3. Príprava vzoriek

4.3.1. Fluorescenčne značené častice

K analýzam boli používané karboxylované polystyrenové častice o veľkosti 30 nm. Okrem pôvodnej disperzie fluorescenčne značených častíc dodanej výrobcom (Sigma Aldrich) boli pripravené aj 100krát a 1000krát deionizovanou vodou riedené disperzie fluorescenčne značených častíc. Pripravené disperzie častíc boli uložené v chladničke.

4.3.2. Zásobný roztok polystyrensulfonátu sodného

Zásobný roztok polystyrensulfonátu sodného bol pripravený o koncentrácii 1 g/l. Po úplnom rozpustení navážky v danom množstve deionizovanej vody bol tento zásobný roztok uložený v chladničke.

4.3.3. Agarózové hydrogély

Pred každým meraním na FCS boli pripravené roztoky agarózových hydrogélů, pričom koncentrácia agarózy v hydrogéli bola 1 hm. %. V závislosti od typu merania bol pripravovaný buď agarózový hydrogél bez prídavku polystyrensulfonátu alebo agarózový hydrogél s prídavkom polystyrensulfonátu v koncentračnej rade 0,002; 0,005 a 0,01 hm. %. Roztoky boli pripravované na celkový objem 5 ml.

Fluorescenčne značené častice boli do hydrogélů inkorporované buď pri príprave roztoku agarózových hydrogélů pridaním 10 μl danej disperzie fluorescenčne značených častíc („častice vo vnútri gélu“) alebo až po gelácii, kedy boli častice inkorporované difúziou z roztoku umiestneného nad jednotlivými gélmi („častice nad gélom“).

Pripravené roztoky boli za stáleho miešania zohrievané až na teplotu 85 °C, aby došlo k úplnému rozpusteniu. Potom boli vložené na 1 minútu do ultrazvuku predhriateho na 80 °C a následne rozliate do držiakov na FCS, kde postupne gél tuhol.

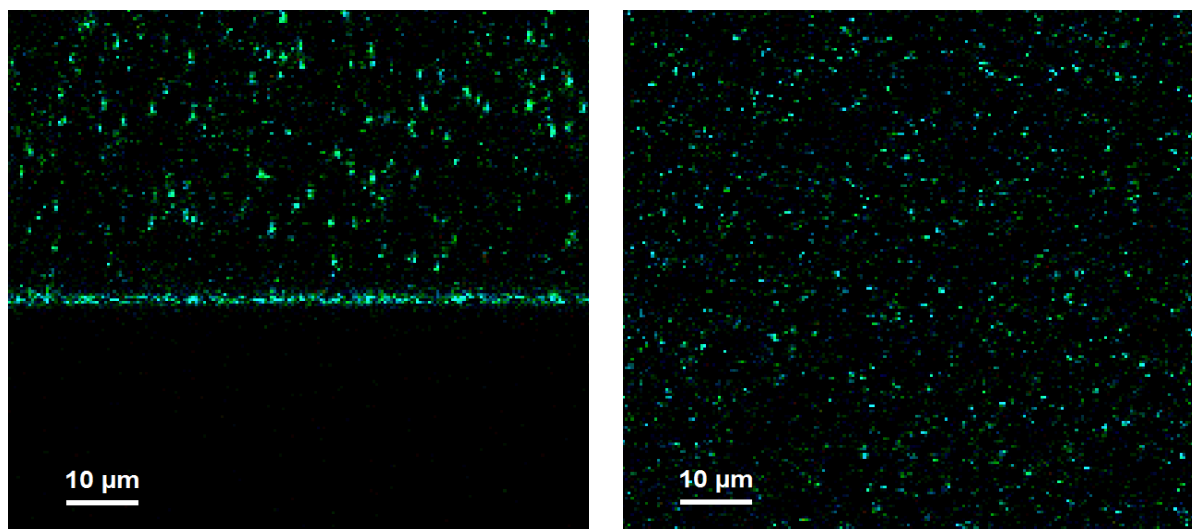
4.4. Nastavenie FCS

4.4.1. Parametre a kalibrácia FCS

FCS analýza prebiehala na prístroji MicroTime 200 od firmy PicoQuant s inverzným konfokálnym mikroskopom Olympus IX71. Využívaný bol objektív s vodnou imerziou, pinhole o veľkosti $50\ \mu\text{m}$ a laser (excitačný zdroj) s vertikálnou polarizáciou o vlnovej dĺžke $467\ \text{nm}$. Dichroické zrkadlo bolo nastavené na hodnotu $470/635\ \text{nm}$ a emisný filter bol nastavený na $520/35\ \text{nm}$.

Pred každým meraním bolo potrebné zistiť veľkosť konfokálneho objemu, pretože tá sa zakaždým mení. Na kalibráciu bola využívaná fluorescenčne značená sonda ATTO 488 o koncentrácii $1\ \text{nM}$. Týmto sa zistila veľkosť efektívneho objemu a hodnota κ , ktorá značí excentricitu, čiže odchýlenie objemu od tvaru gule. Z toho sa následne systémom FCS určili ďalšie rozmery konfokálneho objemu.

Každá vzorka musela byť zameraná v ose z , bol vykonaný xz alebo yz sken, aby bolo nájdené rozhranie gél/sklíčko (Obr. 10). Samotné meranie prebiehalo asi $5\ \mu\text{m}$ nad zistenou hornou hranicou sklíčka (hodnota osy z), aby sa meralo vo vzorke. Vo výslednej hodnote z bol prevedený rez v rovine xy (Obr. 10). V tomto bode bolo možné určiť, či bola daná vzorka gélu homogénna, alebo či sa tam nenachádzali vzduchové bubliny apod.



Obr. 10: Rez rovinou xz (vľavo) a rez rovinou xy (vpravo)

4.4.2. Navrhovaný postup merania FCS

Gély boli pripravované metódami popísanými v podkapitole 4.3.3. Každou metódou bol pripravený len jeden roztok, ktorý bol rozlievaný do dvoch držiakov na FCS. K meraniu sa pristúpilo až po 24 hodinovej difúzii fluorescenčne značených častíc.

Po zameraní roviny xy boli vybrané 3 miesta, v ktorých prebiehala FCS analýza. Body nemohli byť úplne v krajnej oblasti alebo uprostred zagregovaných častíc s vyššou intenzitou fluorescencie, pretože by došlo ku skresleniu výsledkov. Doba analýzy bola stanovená na 5 minút.

Pri meraní sa využívali dva detektory, výstupom FCS analýzy bola kroskorelačná krivka, ktorá bola analyzovaná v móde FCS Analyses. Získané hodnoty difúzných koeficientov boli spriemerované.

K získaniu viskoelastických vlastností sa kroskorelačná krivka prevádzala na MSD pomocou programu MATLAB, kde bol použitý vzorec:

$$\text{MSD} \equiv \langle (x - x_0)^2 \rangle = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N (x_n(t) - x_n(0))^2 \quad (19)$$

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1. Optimalizácia postupu merania

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo stanovenie mikoreologických vlastností najprv prostredníctvom sledovania difuzivity fluorescenčne značených častíc v štruktúre jednotlivých gélov. Sledovaním zmien v pohybe týchto častíc získame informácie o vnútornej štruktúre gélov a stanovíme tak ich mikoreologické vlastnosti. Ako už bolo spomenuté vyššie, merané gély boli pripravené metódou „častice vo vnútri gélu“ a „častice nad gélom“. Pri príprave gélov metódou „častice vo vnútri gélu“ môže dôjsť k tomu, že častice sa nebudú nachádzať iba v póroch s disperzným prostredím, ale aj v polymérnej sieti disperzného podielu, zatiaľ čo pri metóde „častice nad gélom“ by mali častice difundovať iba do pórov s disperzným prostredím. Otázkou teda bolo, ako veľmi sa budú líšiť difúzne koeficienty fluorescenčne značených častíc pri takto pripravených géloch, pričom difúzia týchto častíc prebiehala 24 hodín a samotné meranie prebiehalo 5 minút.

Na začiatok bol stanovený difúzny koeficient fluorescenčne značených častíc vo vode (10 μl roztoku častíc na 5 ml deionizovanej vody), na základe čoho boli potom porovnávané získané hodnoty difúzných koeficientov v štruktúre gélov. Nameraná hodnota difúzneho koeficientu (2,3 $\mu\text{m}^2/\text{s}$) sa rádovo nelíšila od teoretickej hodnoty (7,8 $\mu\text{m}^2/\text{s}$) vypočítanej podľa Stokes-Einsteinovej rovnice (5), ktorá určuje difúzny koeficient guľovitej častice v kvapalnom prostredí pri danej teplote. Rozdiel absolútnych hodnôt teoretického a nameraného difúzneho koeficientu mohol byť spôsobený napríklad lokálnym zahriatím vzorky pri kontakte s laserom.

Podľa postupu merania uvedeného v podkapitole 0 nebolo možné difuzivitu častíc v agarózových hydrogélach vyhodnotiť. Použitá koncentrácia fluorescenčne značených častíc bola zrejme príliš vysoká, pretože fluorescenčný signál nekoreloval, pri stanovovaní kroskorelačnej krivky dochádzalo niekoľkokrát k mnohonásobným nárastom v intenzite fluorescencie, čo bolo zrejme spôsobené zagregovaním fluorescenčne značených častíc. Hodnota konfokálneho objemu sa pohybuje v okolí jedného femtolitra, čo znamená, že konfokálnym objemom by malo prechádzať len veľmi obmedzené množstvo častíc – v ideálnom prípade 1 častica, v tomto prípade tých častíc bolo podľa dostupných parametrov merania (N, \bar{C}) rádovo viac.

Z tohto dôvodu sa ďalší postup optimalizačných experimentov zamerával na nájdenie vhodnej koncentrácie fluorescenčne značených častíc. Skúmané boli disperzie častíc s riedením 1:100 a 1:1000 oproti pôvodnej disperzie častíc. Merané boli len gély typu „častice nad gélom“.

V tomto prípade neboli vyhodnocované difúzne koeficienty, sledovaná bola iba kvalita kroskorelačnej krivky a parametre, ktoré poskytujú informácie o približnom počte častíc difundujúcich konfokálnym objemom. Ako optimálne sa prejavilo riedenie 1:100, a preto bola táto koncentrácia fluorescenčne značených častíc využívaná ďalej v nasledujúcich meraniach.

V nich boli merané opäť agarózové gély (bez prídavku polystyrensulfonátu). Kroskorelačné krivky boli síce získané bez problémov či už v intenzite fluorescencie alebo s agregovaním sondy, avšak difúzne koeficienty (Tab. 1) vychádzali rádovo minimálne 100krát vyššie v porovnaní s difúziou častíc vo vode, čo by znamenalo, že agarózový gél má nižšiu viskozitu ako samotná voda. Takisto si môžeme všimnúť, že difúzny koeficient nameraný pri sledovaní difúzie fluorescenčne značených častíc z roztoku do gélu sa veľmi nelíši od difúzneho koeficientu častíc inkorporovaných do štruktúry hydrogél. To by znamenalo, že častice prešli fázovým rozhraním do celého objemu a difundovali rovnako ako častice inkorporované v štruktúre hydrogél.

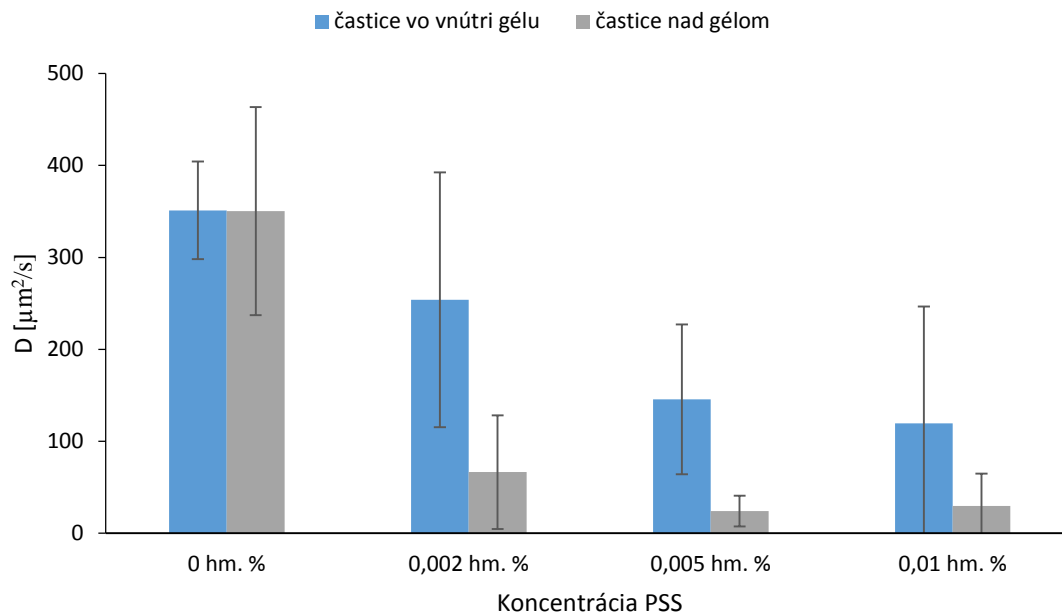
Tab. 1: Porovnanie difúzných koeficientov v agarózovom hydrogéli

Častice vo vnútri gélu	Častice nad gélom
D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	
351 \pm 53	350 \pm 113

Pôvodným cieľom bolo zároveň okrem skúmania štruktúry čistého agarózového hydrogél taktiež sledovanie vplyvu pridávaného polystyrensulfonátu (PSS) na štruktúru a viskoelastické vlastnosti agarózového hydrogél. Merané boli agarózové hydrogély s prídavkom PSS v koncentračnej rade 0,002; 0,005 a 0,01 hm. %. Získané difúzne koeficienty pre rôzne koncentrácie PSS sú zhrnuté v Tab. 2. Pre ľahšiu orientáciu bol zostavený stĺpcový graf znázorňujúci difúzne koeficienty aj s chybovými úsečkami smerodajných odchýlok spolu s čistým agarózovým hydrogélom (Obr. 11)

Tab. 2: Porovnanie difúzných koeficientov v závislosti na koncentrácii pridávaného PSS do štruktúry agarózového hydrogél

Koncentrácia PSS	Častice vo vnútri gélu	Častice nad gélom
	D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	
0,002 hm. %	254 \pm 139	66 \pm 62
0,005 hm. %	146 \pm 82	24 \pm 17
0,01 hm. %	120 \pm 127	29 \pm 35



Obr. 11: Znáznornenie difúzných koeficientov pre agarózový gél bez prídavku PSS a s prídavkom PSS

Je možné sledovať istý trend v poklese difúzných koeficientov pre obe metódy v závislosti na koncentrácii pridávaného polystyrensulfonátu. Difúzne koeficienty sa odvíjajú od interakcií fluorescenčne značených častíc s priestorovou štruktúrou jednotlivých gélov. Z toho vyplýva značný vplyv polystyrensulfonátu na stupeň zosieťovania výsledného hydrogélu. Fluorescenčne značené častice difundujú cez štruktúru modifikovanej polymérnej siete pomalšie, touto štruktúrou sú zadržiavané, a to sa prejaví na výslednom znížení difúzneho koeficientu. Sledovaný je pokles difúzných koeficientov aj pri skúmanej metóde „častice nad géloom“. Častice, ktoré boli do hydrogélv inkorporované difúziou z roztoku umiestneného nad jednotlivými gélmami, zrejme neprešli do celého objemu, alebo ich prešlo len veľmi málo a väčšia časť bola zadržiavaná priestorovou štruktúrou hydrogélu. Aj napriek súvislosti poklesu týchto hodnôt s rastúcou koncentráciou PSS, boli hodnoty difúzných koeficientov ešte stále vysoké.

Prvým testovaným predpokladom takto vysokých hodnôt difúzných koeficientov bola tepelná degradácia a následné uvoľňovanie fluorescenčného farbiva naviazaného na častice pri príprave gélov. Z tohto dôvodu boli opäť merané len vzorky pripravené metódou „častice nad géloom“, pričom difúzia fluorescenčne značených častíc prebiehala 48 hodín kvôli vyššej intenzite fluorescenčného signálu. V súvislosti s tým bol taktiež uskutočnený experiment s povarením a následným zmeraním disperzie fluorescenčne značených častíc. Taktiež bola pripravená čerstvá disperzia fluorescenčne značených častíc, ktorá bola porovnávaná s disperziou častíc pripravenou na začiatku merania prvých experimentov, aby sa predišlo náhodnej agregácii. Podľa pôvodného postupu (4.3.3) bol počas prípravy gélov využívaný aj ultrazvukový kúpeľ. Pri ďalšej príprave sa tomu zamedzilo, aby sa zistilo či nedochádza v dôsledku ultrazvukovania k uvoľneniu fluorescenčného farbiva z častíc. Žiadne spomenuté predpoklady sa nepotvrdili, k významným zmenám v hodnotách difúzných koeficientov nedošlo (viz príloha).

Po vylúčení všetkých vyššie uvedených experimentálnych artefaktov bola ako ďalšie potenciálne vysvetlenie vysokých hodnôt stanovovaného difúzneho koeficientu testovaná hypotéza, či pri použitej nízkej koncentrácii fluorescenčne značených častíc nepochádza získaný fluorescenčný signál z iného zdroja. Autofluorescencia agarózy nebola pri navrhovaní experimentov predpokladaná, pretože agarózové hydrogély sa často využívajú pri ďalších experimentoch zameraných na meranie intenzity fluorescencie pridaných komponentov, napr. na imobilizáciu biologických systémov alebo skúmanie ich transportných vlastností. Aj napriek tomu bol premeraný agarózový hydrogél bez pridávania akýchkoľvek fluorescenčne značených častíc. Meranie prekvapivo preukázalo autofluorescenciu agarózy a metódou FCS bol stanovený difúzny koeficient o hodnote $231 \pm 24 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Fluktácia intenzity fluorescencie je pravdepodobne spôsobená intramolekulárnymi rotačnými pohybmi (pohyby reťazcov agarózy v gélovej sieti), ktorých difúzny koeficient je rádovo vyšší oproti translačnej difuzivite testovaných častíc. Je vysoko pravdepodobné, že upravená koncentrácia fluorescenčne značených častíc, ktorá bola síce prispôbená tak, aby sa v konfokálnom objeme nachádzalo vhodné množstvo častíc na koreláciu kroskorelačných kriviek, bola až príliš nízka na to, aby bola sledovaná intenzita fluorescencie pochádzajúca z difundujúcich častíc. Namiesto toho bola sledovaná iba autofluorescencia agarózy, čo sa prejavilo na všetkých nameraných hodnotách.

Z tohto dôvodu sa pristúpilo opäť k pôvodnej koncentrácii fluorescenčne značených častíc aj napriek tomu, že pri prvých experimentoch fluorescenčný signál nekoreloval. Pre zvýšenie kvality autokorelačných kriviek bolo meranie upravené tak, že prebiehalo tentoraz dlhšiu dobu, a to až 30 minút. Pri dlhšom meraní sa postupne upravili časové fluktuácie intenzity fluorescencie a z výslednej kroskorelačnej krivky bol stanovený difúzny koeficient, ktorý bol v radoch jednotiek, čo odpovedalo predpokladanej difúzii častíc v štruktúre hydrogélu.

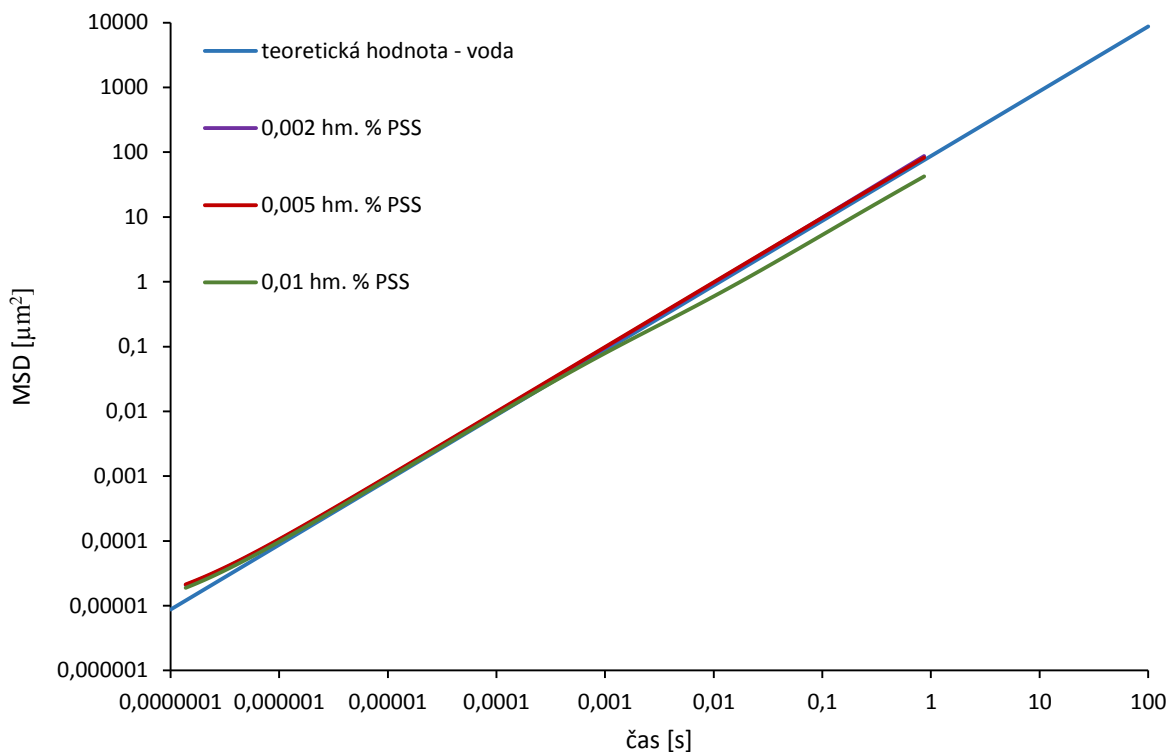
Hlavným výsledkom optimalizačných experimentov prezentovaných v tejto kapitole bol získaný funkčný postup merania FCS signálu, ktorý umožňuje kvantitatívne popísať pohyb častíc v štruktúre gélu a poskytnúť ich základné viskoelastické vlastnosti, predovšetkým vo forme MSD kriviek.

5.2. MSD krivky v závislosti na zložení gélov

Dovtedy sme sa zaoberali popisom mikrореologických vlastností len z pohľadu difúzných koeficientov, no po optimalizácii merania boli stanovené aj MSD krivky jednotlivých skúmaných hydrogélov. V rámci všetkých meraní boli zvolené záporne nabitý polystyrenové častice o veľkosti 30 nm, aby nedochádzalo k interakciám so záporne nabitým PSS. MSD krivky sú výsledkom tepelného pohybu častíc, ktorý súvisí s vnútornou štruktúrou sledovaného materiálu.

Na Obr. 12 je znázornená závislosť MSD na čase pre vodné roztoky polystyrensulfonátu v koncentračnej rade 0,002; 0,005 a 0,01 hm. %. Pre porovnanie experimentálnych dát slúži krivka vody, ktorá má lineárny priebeh. Voda predstavuje newtonovskú kvapalinu, častice sú v takomto médiu zadržiavané len viskóznym tokom a závislosť MSD na čase je teda lineárna. Vo vodných roztokoch s 0,002 a 0,005 hm. % PSS nepozorujeme významné rozdiely vo viskozite, krivky majú opäť lineárny priebeh a zhodujú sa s krivkou vody. V prípade krivky

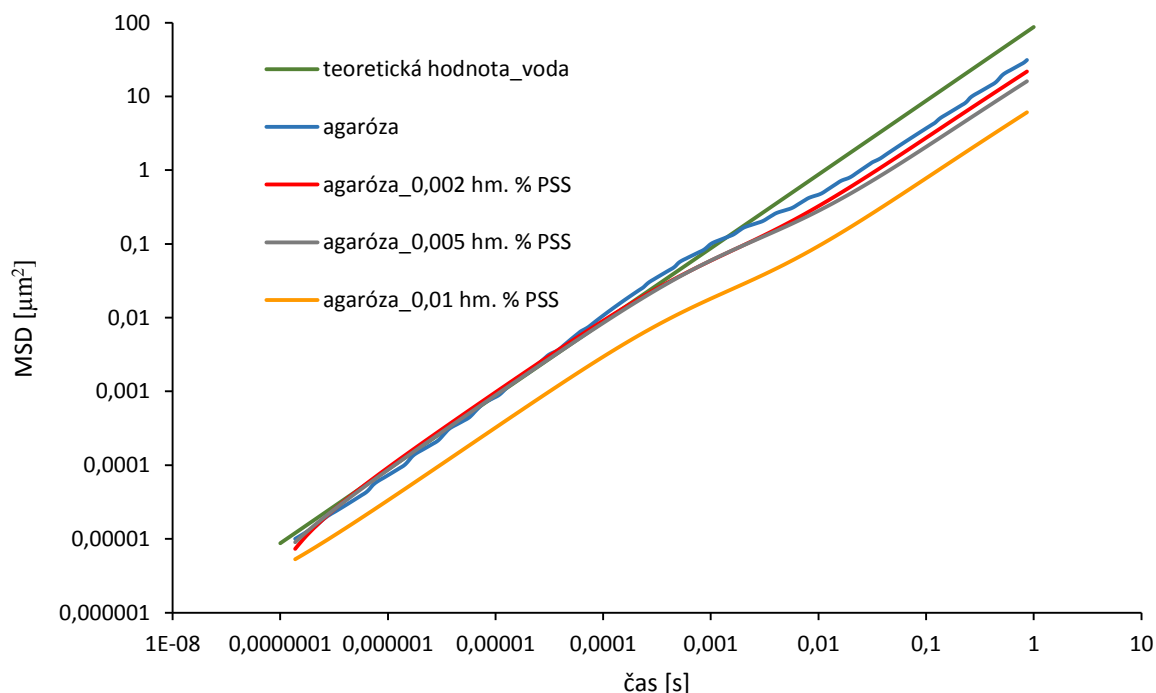
0,01 hm. % PSS, ktorá má ešte stále lineárny priebeh, je už vo vyšších hodnotách MSD pozorované mierne odchylenie krivky voči ostatným krivkám, vyjadrujúce zvýšenie viskozity tohto roztoku. Mierny posun kriviek vodných roztokov PSS voči vode je viditeľný aj v nižších hodnotách MSD, čo zrejme odpovedá frekvenciám na hrane limity spoľahlivosti techniky.



Obr. 12: Závislosť MSD na čase – vodné roztoky polystyrensulfony

Závislosť MSD na čase agarózových hydrogélů s koncentračnou radou PSS je znázornená na Obr. 13. Hydrogély predstavujú viskoelastické materiály, kde tvar MSD kriviek závisí na obsahu viskózneho a elastickej zložky. V krátkych časoch je závislosť MSD na čase lineárna, pohyb častíc vykazuje správanie rovné pohybu častíc vo viskóznom médiu. V stredných časoch MSD sa mení tvar krivky (objavuje sa plató), čo indikuje prevahu elastickej zložky nad zložkou viskóznou a častice sú zadržované štruktúrou. Čím je táto časť posunutá k nižším hodnotám MSD, tým má daný systém väčší podiel elastickej zložky. V dlhších časoch môže byť závislosť MSD na čase opäť lineárna, v prípade kedy častice už nebudú zadržované štruktúrou a budú tak difundovať ďalej. Na Obr. 13 vidíme trend závislosti posunu MSD kriviek na koncentrácii pridávaného polystyrensulfony. Polystyrensulfony má vplyv na výslednú štruktúru agarózového hydrogélu, znižuje podiel viskózneho zložky a zvyšuje podiel zložky elastickej. Podstatou tejto elastickej zložky môžu byť odpudivé elektrostatické sily, ktoré bránia kontaktu častíc s polymérnou zložkou (PSS) a obmedzujú voľný priestor, ktorý majú častice v gélovej štruktúre k dispozícii. V ideálne elastickej médiu sú začlenené častice zakliesnené a vôbec sa nepohybujú. V prípade agarózového

hydrogél s prídavkom 0,01 hm. % PSS je posun MSD krivky výraznejší, čo súvisí s vyššou viskozitou samotného vodného roztoku 0,01 hm. % PSS (Obr. 12).



Obr. 13: Závislosť MSD na čase – agarózové hydrogély s koncentračnou radou PSS

Pred stanovovaním MSD kriviek je dôležité poznať približnú štruktúru skúmaného hydrogél, pretože od toho sa odvíja následne aj výber veľkosti použitých častíc. Výrazne menšie častice by neodrážali viskoelastické vlastnosti zosieťovanej štruktúry hydrogél, ale iba samotného rozpúšťadla. Naopak, použitie výrazne väčších častíc by malo za následok stanovenie celkovej (priemernej) reologickej odozvy rovnako ako pri použití reometrov v klasickej reológii. Ďalšou náplňou experimentálnej práce by sa z tohto dôvodu mala stať podrobnejšia štruktúrna charakterizácia použitých gélov, napr. s využitím porozimetrie či rozptylových technik.

6 ZÁVER

Cieľom tejto bakalárskej práce bola optimalizácia fluorescenčnej korelačnej spektroskopie za účelom stanovenia štruktúry a viskoelastických vlastností agarózových hydrogélů o rôznom zložení.

Problémy sa objavili hneď pri prvom meraní, kedy nebolo možné difuzivitu častíc v agarózových hydrogélů kvôli príliš vysokej koncentrácii fluorescenčne značených častíc v konfokálnom objeme vyhodnotiť. Po upravení koncentrácie bol už pri ďalších meraniach počet fluorescenčných častíc v konfokálnom objeme optimálny, avšak difúzne koeficienty vychádzali rádovo 100krát vyššie ako bolo predpokladané, či už v prípade agarózových hydrogélů bez alebo s prídavkom polystyrensulfonyátu. To by znamenalo, že hydrogélůvé systémy majú nižšiu viskozitu ako samotné rozpúšťadlo. Overovaním prípadnej tepelnej degradácie alebo agregácie fluorescenčne značených častíc sa problém s takto vysokými hodnotami nevyriešil.

Prekvapivou príčinou vysokých hodnôt difúzných koeficientov bola autofluorescencia agarózy ($D = 231 \pm 24 \mu\text{m}^2/\text{s}$), ktorá bola preukázaná meraním bez pridávania fluorescenčne značených častíc. Autofluorescencia nebola vôbec očakávaná, pretože agaróza sa bežne využíva pri ďalších experimentoch zameraných na meranie intenzity fluorescencie pridaných komponentov, napr. na imobilizáciu alebo skúmanie transportných vlastností biologických systémov. Ukázalo sa, že upravená koncentrácia fluorescenčne značených častíc bola až príliš nízka a namiesto intenzity fluorescencie pochádzajúcej z difundujúcich častíc bola sledovaná iba autofluorescencia agarózy, čo sa prejavilo na všetkých zatiaľ skúmaných vzorkách.

V ďalších experimentoch sa začala používať pôvodná koncentrácia disperzie častíc aj napriek ich vysokému množstvu v konfokálnom objeme pri počiatočných experimentoch. Problém vysokého obsahu častíc v konfokálnom objeme sa kompenzoval tým, že analýza tentokrát prebiehala 30 minút namiesto pôvodných piatich. Pri dlhšej dobe merania sa postupne upravili časové fluktuácie intenzity fluorescencie a difúzny koeficient bol stanovený v rádoch jednotiek, čo odpovedalo predpokladanej difúzii častíc v štruktúre hydrogélů. Následne sa pristúpilo k stanoveniu MSD kriviek. Zo závislosti MSD na čase sa potvrdil vplyv pridávaného polystyrensulfonyátu na výsledné viskoelastické vlastnosti agarózového hydrogélů.

V budúcnosti by bolo vhodné zamerať sa na štruktúrnu príčinu tejto autofluorescencie a následne podrobnejšie charakterizovať štruktúru agarózových hydrogélů, a to v podobe určenia distribúcie veľkosti jednotlivých pórov. Po úspešnej charakterizácii štruktúry následne skúmať vplyv pridávaných polyelektrolytov na výsledné štruktúrne a viskoelastické vlastnosti opäť v závislosti na veľkosti použitých častíc. Mikroreológia umožňuje meranie v širšom rozsahu frekvencií, čo poskytuje možnosť podrobnejšie sledovať priebeh gelácie či degradácie gélů a následne z MSD kriviek stanoviť závislosť viskoelastických modulov na čase. Výsledky by bolo možné porovnať s predošlými reologickými meraniami a tým by sme získali komplexný pohľad na viskoelastické vlastnosti gélů aj z pohľadu mikroreológie.

Aj napriek mnohým problémom bola optimalizácia mikroreologickej metódy FCS úspešná, stanovil sa funkčný postup analýzy k získaniu MSD kriviek, ktoré sú významné pri stanovovaní mikroreologických vlastností.

7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠÍŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 3., přeprac. a rozš. Praha: VŠCHT, 1999. ISBN 8070803371.
- [2] AHMED, Enas. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research* [online]. 2015, 6(2), 105-121 [cit. 2017-01-17]. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006. ISSN 20901232. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090123213000969>
- [3] WILSON, Keith a John WALKER. *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. 7th ed. New York: Cambridge University Press, 2009. ISBN 0521731674.
- [4] Ultrapure Agarose. ThermoFisher Scientific [online]. b.r. [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/16500500>
- [5] RINAUDO, Marguerite. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International* [online]. 2008, 57(3), 397-430 [cit. 2017-01-17]. DOI: 10.1002/pi.2378. ISSN 09598103. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pi.2378>
- [6] CONNELL, Louise, Frederik ROMER, Marta SUÁREZ et al. Chemical characterisation and fabrication of chitosan–silica *hybrid scaffolds* with 3-glycidoxypopyl trimethoxysilane. *J. Mater. Chem. B* [online]. 2014, 2(6), 668-680 [cit. 2017-01-18]. DOI: 10.1039/C3TB21507E. ISSN 2050750x. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3TB21507E>
- [7] STEINBÜCHEL, A. a M. HOFRICHTER. *Biopolymers*. 5th ed. Chichester: Wiley-VCH, 2003. ISBN 9783527302260.
- [8] LEE, Kuen a David MOONEY. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science* [online]. 2012, 37(1), 106-126 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003. ISSN 00796700. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670011000918>
- [9] JIAO, Guangling, Guangli YU, Junzeng ZHANG a H. EWART. Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. *Marine Drugs* [online]. 2011, 9(12), 196-223 [cit. 2017-04-07]. DOI: 10.3390/md9020196. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1660-3397/9/2/196/>
- [10] WILLENBACHER, Norbert a Kristina GEORGIEVA. *Rheology of Disperse Systems. Product Design and Engineering* [online]. 1st. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2013, s. 44 [cit. 2016-12-26]. DOI: 10.1002/9783527654741.ch1. ISBN 9783527654741. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527654741.ch1>
- [11] SHAW, Duncan. *Introduction to colloid and surface chemistry*. 4th ed. Boston: Butterworth-Heinemann, 1992. ISBN 07-506-1182-0.

- [12] WESTPHAL, Egon. The Rheology Handbook: For Users of Rotational and Oscillatory Rheometers. 3. Ausg. Hannover: C.R. Vincentz, 1980. ISBN 3878701748.
- [13] BREEDVELD, V. a D. J. PINE. Microrheology as a tool for high-throughput screening. *Journal of Materials Science* [online]. 2003, 38(22), 4461-4470 [cit. 2017-05-16]. DOI: 10.1023/A:1027321232318. ISSN 00222461. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1027321232318>
- [14] W., Bradley, Stephen KEEN, Philipus J., Yacine HEMAR a Martin A.K. A Practical Review of Microrheological Techniques. *Rheology - New Concepts, Applications and Methods* [online]. InTech, 2013, 2(13), 23 [cit. 2017-01-26]. DOI: 10.5772/53639. ISBN 9789535109532. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/rheology-new-concepts-applications-and-methods/a-practical-review-of-microrheological-techniques>
- [15] MOSCHAKIS, Thomas. Microrheology and particle tracking in food gels and emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. 2013, 18(4), 311-323 [cit. 2017-01-26]. DOI: 10.1016/j.cocis.2013.04.011. ISSN 13590294. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135902941300068X>
- [16] CICUTA, Pietro a Athene DONALD. Microrheology: a review of the method and applications. *Soft Matter* [online]. 2007, 3(12), 1449- [cit. 2016-12-29]. DOI: 10.1039/b706004c. ISSN 1744683x. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b706004c>
- [17] SHAW, Ryan. Dynamic Light Scattering Training. In: Atascientific [online]. 2014 [cit. 2017-01-29]. Dostupné z: 149.171.168.221/partcat/wp-content/uploads/malvern-zetasizer-ls.pdf
- [18] VALENTINE, M., P. KAPLAN, D. THOTA, J. CROCKER, T. GISLER, R. PRUD'HOMME, M. BECK a D. WEITZ. Investigating the microenvironments of inhomogeneous soft materials with multiple particle tracking. *Physical Review E* [online]. 2001, 64(6), - [cit. 2016-11-28]. DOI: 10.1103/PhysRevE.64.061506. ISSN 1063651x. Dostupné z: <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.64.061506>
- [19] Fluorescence correlation spectroscopy: The Femtoliter Test Tube – System Calibration and In Vitro Applications. Leica microsystems: Science Lab [online]. b.r. [cit. 2017-03-30]. Dostupné z: <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/fluorescence-correlation-spectroscopy/>
- [20] JOSEPH R. LAKOWICZ., . Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN 978-038-7463-124.
- [21] FERREJA, Tadesse Haile, Ariaya HYMETE a Thirumurugan GUNASEKARAN. A Recent Review on Chemiluminescence Reaction, Principle and Application on Pharmaceutical Analysis. *ISRN Spectroscopy* [online]. 2013, 2013, 1-12 [cit. 2017-04-17]. DOI: 10.1155/2013/230858. ISSN 20908776. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/230858/>

- [22] WÖLL, Dominik. Fluorescence correlation spectroscopy in polymer science. RSC Adv [online]. 2014, 4(5), 2447-2465 [cit. 2017-03-16]. DOI: 10.1039/C3RA44909B. ISSN 20462069. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3RA44909B>
- [23] RATHGEBER, Silke, Hans-Josef BEAUVISAGE, Hubert CHEVREAU, Norbert WILLENBACHER a Claude OELSCHLAEGER. Microrheology with Fluorescence Correlation Spectroscopy. Langmuir [online]. 2009, 25(11), 6368-6376 [cit. 2017-03-30]. DOI: 10.1021/la804170k. ISSN 07437463. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la804170k>
- [24] BERANOVÁ, Lenka, Jana HUMPOLÍČKOVÁ a Martin HOF. Fluorescenční korelační spektroskopie. Chemické listy [online]. 2009, 103(2), 125-129 [cit. 2017-03-30]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_02_125-129.pdf
- [25] NORDQVIST, David a Thomas VILGIS. Rheological Study of the Gelation Process of Agarose-Based Solutions. Food Biophysics [online]. 2011, 6(4), 450-460 [cit. 2016-12-21]. DOI: 10.1007/s11483-011-9225-0. ISSN 15571858. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11483-011-9225-0>
- [26] RUSS, Natalie, Birgitta ZIELBAUER, Kaloian KOYNOV a Thomas VILGIS. Influence of Nongelling Hydrocolloids on the Gelation of Agarose. Biomacromolecules [online]. 2013, 14(11), 4116-4124 [cit. 2016-12-21]. DOI: 10.1021/bm4012776. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm4012776>
- [27] LE GOFF, Kevin, Cedric GAILLARD, William HELBERT, Catherine GARNIER a Thierry AUBRY. Rheological study of reinforcement of agarose hydrogels by cellulose nanowhiskers. Carbohydrate Polymers [online]. 2015, 116, 117-123 [cit. 2017-01-05]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.04.085. ISSN 01448617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861714004421>
- [28] AUFDERHORST-ROBERTS, Anders, William FRITH a Athene DONALD. A microrheological study of hydrogel kinetics and micro-heterogeneity. The European Physical Journal E [online]. 2014, 37(5), - [cit. 2017-01-05]. DOI: 10.1140/epje/i2014-14044-y. ISSN 1292-8941. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1140/epje/i2014-14044-y>
- [29] FATIN-ROUGE, Nicolas, Konstantin STARCHEV a Jacques BUFFLE. Size Effects on Diffusion Processes within Agarose Gels. Biophysical Journal [online]. 2004, 86(5), 2710-2719 [cit. 2016-12-19]. DOI: 10.1016/S0006-3495(04)74325-8. ISSN 00063495. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349504743258>
- [30] FATIN-ROUGE, Nicolas, Kevin WILKINSON a Jacques BUFFLE. Combining Small Angle Neutron Scattering (SANS) and Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) Measurements To Relate Diffusion in Agarose Gels to Structure. The Journal of Physical Chemistry B [online]. 2006, 110(41), 20133-20142 [cit. 2016-12-21]. DOI: 10.1021/jp060362e. ISSN 15206106. Dostupné z:

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp060362e>

- [31] AMIN, S., S. BLAKE, S. KENYON, R. KENNEL a E. LEWIS. A novel combination of DLS-optical microrheology and low frequency Raman spectroscopy to reveal underlying biopolymer self-assembly and gelation mechanisms. *The Journal of Chemical Physics* [online]. 2014, 141(23), 234201- [cit. 2016-11-24]. DOI: 10.1063/1.4903785. ISSN 00219606. Dostupné z: <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/jcp/141/23/10.1063/1.4903785>
- [32] JIN, Naixiong, Emily MORIN, Daniel HENN, Yu CAO, Jeremiah WOODCOCK, Shuangcheng TANG, Wei HE a Bin ZHAO. Agarose Hydrogels Embedded with pH-Responsive Diblock Copolymer Micelles for Triggered Release of Substances. *Biomacromolecules*. 2013, 14(8), 2713-2723. DOI: 10.1021/bm4005639. ISSN 1525-7797. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm4005639>
- [33] DATE, Pranjali a Divya OTTOOR. PH Dependent Controlled Release of CTAB Incorporated Dipyrindamole Drug from Agar-Based Hydrogel. *Polymer-Plastics Technology and Engineering* [online]. 2015, 55(4), 403-413 [cit. 2016-11-26]. DOI: 10.1080/03602559.2015.1098685. ISSN 03602559. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03602559.2015.1098685>
- [34] MENDES, Ana, Elhamalsadat SHEKARFOROUSH, Christoph ENGWER, Sophie BEEREN, Christian GORZELANNY, Francisco GOYCOOLEA a Ioannis CHRONAKIS. Co-assembly of chitosan and phospholipids into hybrid hydrogels. *Pure and Applied Chemistry* [online]. 2016, 88(9), - [cit. 2016-12-04]. DOI: 10.1515/pac-2016-0708. ISSN 13653075. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/pac.2016.88.issue-9/pac-2016-0708/pac-2016-0708.xml>
- [35] DE MORAIS, W.A., M.R. PEREIRA a J.L.C. FONSECA. Characterization of gelification of chitosan solutions by dynamic light scattering. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2012, 87(4), 2376-2380 [cit. 2017-01-30]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.11.002. ISSN 01448617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014486171100988X>

8 PRÍLOHA

Tab. 3: Prehľad difúzných koeficientov pri skúmaní rôznych vplyvov

Predpoklad		D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]
tepelná degradácia	Disperzia častíc po povarení	12 \pm 1
	Disperzia častíc pred povarením	14 \pm 1
agregácia	„čerstvá“ disperzia častíc + difúzia 48h	337 \pm 50
	„staršia“ disperzia častíc + difúzia 48h	350 \pm 25
	„staršia“ disperzia častíc + difúzia 24h	350 \pm 113